

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年12月27日 (27.12.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/97857 A1

(51) 国際特許分類⁷: A61K 48/00, 31/711, 31/7105, 47/42

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/05195

(22) 国際出願日: 2001年6月19日 (19.06.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-184502 2000年6月20日 (20.06.2000) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 住友製薬株式会社 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒541-8510 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号 Osaka (JP). 株式会社高研 (KOKEN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒171-0031 東京都豊島区目白3丁目14番3号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 久保田俊一郎 (KUBOTA, Shunichiro) [JP/JP]; 〒191-0033 東京都日野市百草878番10号 Tokyo (JP). 寺田雅昭 (TERADA, Masaaki) [JP/JP]; 〒177-0053 東京都練馬区関町南2丁目17番14号 Tokyo (JP). 落谷孝広 (OCHIYA, Takahiro) [JP/JP]; 〒104-0045 東京都中央区築地5丁目1番1号 国立がんセンター築地宿舎218号室 Tokyo (JP). 伊藤博 (ITOH, Hiroshi) [JP/JP]; 〒171-0032 東京都豊島区雑司が谷3丁目3番25号 Tokyo (JP). 古瀬正康 (FURUSE, Masayasu) [JP/JP]; 〒228-0814 神奈川県相模原市南台3

丁目8番9号 Kanagawa (JP). 佐野明彦 (SANO, Akihiko) [JP/JP]; 〒560-0011 大阪府豊中市上野西1丁目7番22号 Osaka (JP). 永原俊治 (NAGAHARA, Shunji) [JP/JP]; 〒567-0841 大阪府茨木市桑田町2番1号 住友化学茨木アパート3棟348号 Osaka (JP).

(74) 代理人: 青山 葵, 外 (AOYAMA, Tamotsu et al.); 〒540-0001 大阪府大阪市中央区見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: PREPARATIONS FOR OLIGONUCLEOTIDE TRANSFER

(54) 発明の名称: オリゴヌクレオチド導入製剤

(57) Abstract: Preparations being useful in treatments for various diseases and containing collagen as an essential component whereby oligonucleotides necessary in antisense therapy or the like can be efficiently transferred into animal cells.

(57) 要約:

アンチセンス療法等に必要なオリゴヌクレオチドを細胞に効率よく導入でき、種々の疾患を治療に有用な、コラーゲンを必須成分とする動物細胞への所望のオリゴヌクレオチド導入製剤。

WO 01/97857 A1

明細書

オリゴヌクレオチド導入製剤

5 技術分野

本発明はアンチセンス治療に使用される、コラーゲンを必須成分とする標的細胞へのオリゴヌクレオチド導入製剤に関する。さらに詳細には、本発明はコラーゲンを必須成分とすることにより、標的細胞に効率よくオリゴヌクレオチドを導入できる安全な製剤に関する。

10 背景技術

近年の遺伝子情報解析技術の急速な進歩によって、疾病の原因となる遺伝子情報が蓄積されてきている。例えば、感染症の分野に於いては、細菌やウイルスが増殖あるいは生存するのに必須な遺伝子情報が明らかになっている。また、種々の疾患において、原因となる遺伝子情報、あるいはその遺伝子情報の過剰な発現や変異などが明らかとなり、その遺伝子情報と症状を発現するメカニズムの関係が明らかになってきている。

アンチセンス療法は上記のような疾患に関する遺伝子情報の発現を制御または抑制してその疾患の治療や予防を行う方法である。

具体的には例えば、

20 (1)発現を制御または抑制したい遺伝子のm-RNAまたはm-RNA前駆体と相補的な塩基配列を有する10量体～30量体程度のオリゴヌクレオチドを投与し、
(2)細胞内で該オリゴヌクレオチドがm-RNAまたはm-RNA前駆体と二重鎖を形成し、
(3)リボゾームによるm-RNAの翻訳の阻害、RNase Hによる二重鎖の切断、あるいはm-RNA前駆体のスプライシングを阻害し、
これにより遺伝子の発現を抑制する。

また、これ以外に直接標的の遺伝子の二重鎖DNAに結合して三重鎖を形成し、m-RNAへの転写を阻害する方法もある。

アンチセンス療法は1970年代の後半にT's' OとMillerら(Biochemistry, 16, 1988-1996, 1977)およびZamecnikら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 280-284, 1978)によって提唱されて以来、盛んに研究が行われてきた。当初、アンチセンス療法の研究は天然型のDNAあるいはRNAの

5 オリゴヌクレオチドを用いて行われたが、例えば、

(1)天然型のオリゴヌクレオチドは生体内のヌクレアーゼにより短時間に分解され失活すること、

(2)また、負に荷電したオリゴヌクレオチドが同じく負に荷電した細胞膜を通過して細胞内に入ることは困難であること等

10 の問題がある。このことから、DNAあるいはRNAの構造を基本として様々に修飾を施したオリゴヌクレオチドが開発され、用いられている。これらの修飾を施したオリゴヌクレオチドのうち最も実用的であるのは、各ヌクレオシド間のジエステル結合をホスホロチオエート結合に置換したホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド(以下、S-オリゴヌクレオチドと略す。)である。現在までに実施されたほとんどの臨床試験では、S-オリゴヌクレオチドが使用されている。

しかしながらS-オリゴヌクレオチドであっても、例えば

(1)天然型オリゴヌクレオチドほど早くはないが、生体内のヌクレアーゼによつて分解され失活する、

(2)天然型オリゴヌクレオチドに比べてm-RNAへの二重鎖形成能力が低い、

20 (3)二重鎖形成能力が低いために高濃度で標的細胞に投与する必要がある、

(4)高濃度で全身的に投与した場合、サイトカインの放出や血液凝固の阻止や補体の活性化、アレルギー反応などを生じる、

(5)生体内のタンパク質と特異的あるいは非特異的に結合するため、標的m-RNAと二重鎖を形成できないばかりでなく非特異的な作用を生じる、等の

25 問題があり、アンチセンス療法の要求を充分に満たせているわけではなく、実用化には至っていない。これらの問題点は第一世代とされるS-オリゴヌクレオチドに限らず、現在までに開発されているいわゆる第二および第三世代のアンチセンス療法用オリゴヌクレオチド(横山和尚、化学と生物, 36, 556-559, 1998)に当てはまる。これらの問題点のため、オリゴヌクレオチドを用いた標的遺伝子の

発現抑制は *in vitro* では良い効果が得られても、 *in vivo* 特に臨床試験では良い効果が得られないというのが一般的な認識となっており、実際、アンチセンス医薬品の臨床実験が良い効果が得られないため中止される例は多い。

村上はこれらの臨床試験が打ち切られた理由がアンチセンス医薬品のデリバリーにあるとし、アンチセンス医薬品開発の成否はデリバリー方法の開発が左右すると述べている(村上 章、生体の科学, 49, 309-314, 1998)。オリゴヌクレオチドをデリバリーする方法は、これまで主としてオリゴヌクレオチドの細胞内への透過性と移行を改善することを目的として種々の検討が行われてきた。これらを解決するために横山の総説(横山和尚、細胞工学, 16, 1463-1473, 1997)では、

(1) ポリーエーリジンやポリエチレンイミンなどの多荷電化合物とオリゴヌクレオチドを共役させる、

(2) 複製欠損アデノウイルスのカプシドの存在下でトランスフェリン／ポリーエーリジン－共役DNAを使用する、

(3) インフルエンザウイルスHA表面タンパク質由来の fusogenic peptide (Bongartz, J. P. ら, Nucleic Acids Research, 22, 4681-4688, 1994) やショウジョウバエの *Antennapedia* タンパク質のホメオドメインの断片を使用する、

(4) 葉酸あるいはアシアロ糖タンパク質受容体、またはトランスフェリンとオリゴヌクレオチドを結合させ、特異的な細胞表面の受容体にターゲッティングする、

(5) コレステロールと結合する、

(6) カチオン性脂質へ封入する、

等の方法が挙げられている。これらの検討はオリゴヌクレオチドの細胞内への透過性と移行を改善することを主眼とはしているものの、細胞に直接オリゴヌクレオチドを投与できる *in vitro* の実験では良い効果が得られても、 *in vivo* では期待された充分な効果は得られておらず、実用化には問題があった。

例えば、カチオン性脂質(リポソーム)にオリゴヌクレオチドを封入して投与する方法は、 *in vitro* ではオリゴヌクレオチドを細胞内に効率よく導入するため最も盛んに研究されているが、 *in vivo* では投与後直ちに全身に拡散するため高濃度で標的細胞に作用できること、体内のタンパク質がリポソーム

ムに結合して標的細胞への接着を阻害すること、リポソームを構成しているカチオン性脂質に細胞毒性があることなどから実用的なレベルでの成果は得られていない。実際、S-オリゴヌクレオチドを用いた臨床試験でリポソームが使用されたことはなく(生体の科学, 49, 309-314, 1998)、臨床に実用的なオリゴヌクレオチドのデリバリー方法の開発が望まれている。

一方、プラスミドDNAまたはウイルスベクターを生体親和性材料あるいは骨親和性材料から徐々に溶出させて、遺伝子導入を行う方法が特開平9-71542、US5,763,416に開示されている。これらにはコラーゲン等の生体親和性材料あるいは骨親和性材料が分子量265万～530万のプラスミドDNA(4000bp～8000bpに相当)あるいはそれ以上の分子サイズを有するウイルスベクターを生体内で徐放して良好な発現効率を示すことが記載されている。しかし、これらプラスミドDNAまたはウイルスベクターの導入が要求される標的細胞一つあたりに、導入されるプラスミドDNAまたはウイルスベクターの個数は、アンチセンス療法で要求されるオリゴヌクレオチドの導入個数に比べて極めて小さい。これはプラスミドDNAあるいはウイルスベクターにコードされた遺伝情報は標的細胞に導入された後、多数のm-RNAに転写されて発現するため、標的細胞一つあたり一個のプラスミドDNAあるいはウイルスベクターが導入されれば、遺伝子の発現が見られるためこれで充分であるからである。一方、アンチセンス療法においては、オリゴヌクレオチドが細胞内に導入され、標的のm-RNAと強固な二重鎖を形成し遺伝子発現を抑制するためには、細胞内のオリゴヌクレオチド濃度を極力高める必要がある。上記特開平9-71542およびUS5,763,416には、コラーゲン等の生体親和性材料あるいは骨親和性材料が、プラスミドDNAあるいはウイルスベクターに比して極めて小さいオリゴヌクレオチド(一本鎖であって、分子量が約3,300～約9,900程度)を徐放し、かつ遺伝子発現を抑制することができるか否か、更に標的細胞内において、臨床上、充分に、有効な濃度にオリゴヌクレオチド濃度を高めることができるか否かについては、具体的にはなにも示唆されていない。

更に上記先行技術には、アンチセンス療法に用いることのできる下記のような特徴を持つオリゴヌクレオチド導入製剤はなにも示唆されていない。

- 1) 生体に投与したオリゴヌクレオチドがヌクレアーゼによる分解から保護されること。
- 2) 生体に投与したオリゴヌクレオチドを生体内のタンパク質との特異的あるいは非特異的な結合から保護すること。
- 5 3) 標的m-RNAと強固な二重鎖を形成して発現を抑制できるように細胞内のオリゴヌクレオチドの濃度を高めるために、標的細胞周囲でのオリゴヌクレオチドの濃度を高濃度に維持すること。
- 4) 全身性の副作用を生じないように標的細胞周囲のみでオリゴヌクレオチドの濃度を高濃度に維持すること。
- 10 5) 一回の投与あたりの、m-RNAの発現を抑制できる期間を長期化することが求められること。

発明の開示

本発明の課題は、アンチセンス療法等に必要なオリゴヌクレオチドを細胞に効率よく導入できる剤を提供し、種々の疾患を治療することにある。

15 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、標的m-RNAと相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとコラーゲン(更に医療上許容される添加剤)からなる製剤が、in vivoで副作用を誘発することなく標的m-RNAの発現を効果的に抑制し、かつ長期にその効果が維持されることを見出し、さらに検討を重ね、本発明を完成するに至った。

図面の簡単な説明

第1図は試験例1における3%アガロースグル電気泳動図である。実施例1と参考例1のオリゴヌクレオチド製剤中でのホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレアーゼによる影響を示している。レーン1：実施例1-0分後、レーン2：実施例1-30分後、レーン3：実施例1-60分後、レーン4：実施例1-180分後、レーン5：参考例1-0分後、レーン6：参考例1-30分後、レーン7：参考例1-60分後、レーン8：参考例1-180分後。

第2図は実施例1のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト精巣腫瘍細胞(NEC-8)を移植したヌードマウスの精巣に投与した場合、NEC-8細胞の増殖を

長期間抑制したことを示したグラフである。

第3図は実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト胃癌細胞に *in vitro* で添加した場合に、参考例4のアテロコラーゲン溶液、参考例5のアンチセンスオリゴヌクレオチド溶液、参考例6のスクランブルオリゴヌクレオチド組成物を添加した場合に比べて、ヒト胃癌細胞の増殖を抑制し、かつ細胞数を減少させたことを示したグラフである。

第4図は実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤による *in vitro* におけるヒト横紋筋肉腫細胞の増殖抑制効果を、オリゴヌクレオチド導入製剤に含有するホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度で比較したグラフである。

第5図は実施例3のリポソームを含有したオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト横紋筋肉腫細胞に *in vitro* で添加した場合、参考例7のリポソーム製剤に比べて強い殺細胞効果を示したグラフである。

第6図は実施例3のリポソームを含有したオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト横紋筋肉腫細胞に *in vitro* で添加した場合、参考例7のリポソーム製剤に比べて強くオルニチン脱炭酸酵素の活性を低下させたことを示すグラフである。

第7図は実施例7のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト横紋筋肉腫細胞を移植したヌードマウスの横紋筋肉腫移植部位に投与した場合、参考例4のアテロコラーゲン溶液に比べて長期間横紋筋肉腫細胞の増殖を抑制したことを示すグラフである。

第8図は実施例7のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト横紋筋肉腫細胞を移植したヌードマウスの横紋筋肉腫移植部位に投与した場合、参考例7のリポソーム製剤に比べて長期間横紋筋肉腫細胞の増殖を抑制したことを示すグラフである。

第9図は実施例7のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト横紋筋肉腫細胞を移植したヌードマウスの横紋筋肉腫移植部位、横紋筋肉腫を移植した対側の背部筋肉内、腹腔内に投与した場合、リポソーム製剤を横紋筋肉腫移植部位に投与した場合に比べてすべての部位で横紋筋肉腫細胞の増殖を長期間抑制したことを示したグラフである。

第10図は実施例7のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト横紋筋肉腫細胞を移

植したヌードマウスの横紋筋肉腫細胞移植部位に投与した場合、参考例4のアテロコラーゲン溶液を投与した場合に比べてヌードマウスの延命率を高めたことを示したグラフである。

第11図は実施例7のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト横紋筋肉腫細胞を移植したヌードマウスの横紋筋肉腫細胞移植部位に投与した場合、参考例7のリポソーム製剤を投与した場合に比べてヌードマウスの延命率を高めたことを示したグラフである。

第12図は実施例7のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト横紋筋肉腫細胞を移植したヌードマウスの横紋筋肉腫細胞移植部位に投与した場合、参考例4のアテロコラーゲン溶液を投与した場合に比べて横紋筋肉腫細胞内のオルニチン脱炭酸酵素の産生が強く抑制されたことを示したグラフである。

第13図は実施例7のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト横紋筋肉腫細胞を移植したヌードマウスの横紋筋肉腫細胞移植部位に投与した場合、参考例7のリポソーム製剤を投与した場合に比べて横紋筋肉腫細胞内のオルニチン脱炭酸酵素の産生が強く抑制されたことを示したグラフである。

第14図は実施例7のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト胃癌細胞を移植したヌードマウスのヒト胃癌細胞移植部位に投与した場合、参考例4のアテロコラーゲン溶液、参考例6のオルニチン脱炭酸酵素の遺伝子配列に非相同な配列を有したホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドを含有する溶液状組成物を投与した場合に比べて、ヒト胃癌細胞の増殖を長期間抑制したことを示したグラフである。

第15図は実施例7のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト胃癌細胞を移植したヌードマウスのヒト胃癌細胞移植部位に投与した場合、参考例4のアテロコラーゲン溶液、参考例6のオルニチン脱炭酸酵素の遺伝子配列に非相同な配列を有したホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドを含有する溶液状組成物を投与した場合に比べてヌードマウスの延命率を高めたことを示したグラフである。

第16図は実施例7のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト胃癌細胞を移植したヌードマウスの胃癌細胞移植部位に投与した場合、参考例4のアテロコラーゲン溶液、参考例6のオルニチン脱炭酸酵素の遺伝子配列に非相同な配列を有したホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドを含有する溶液状組成物を投与した場合

に比べて胃癌細胞内でのオルニチン脱炭酸酵素の産生が強く抑制されたことを示したグラフである。

第17図は実施例7のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト大腸癌細胞を移植したヌードマウスの大腸癌細胞移植部位に投与した場合、参考例4のアテロコラーゲン溶液を投与した場合に比べて、大腸癌細胞の増殖を長期間抑制したことを示したグラフである。

第18図は実施例7のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト大腸癌細胞を移植したヌードマウスの大腸癌細胞移植部位に投与した場合、参考例4のアテロコラーゲン溶液を投与した場合に比べて、ヌードマウスの延命率を高めたことを示したグラフである。

第19図は実施例7のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト大腸癌細胞を移植したヌードマウスの大腸癌細胞移植部位に投与した場合、参考例4のアテロコラーゲン溶液を投与した場合に比べて、大腸癌細胞内でのオルニチン脱炭酸酵素の産生が強く抑制されたことを示したグラフである。

第20図は実施例7のオリゴヌクレオチド導入製剤をマウス平滑筋肉腫細胞(LMFS細胞)にin vitroで添加した場合に、対照例に比べてマウス平滑筋肉腫細胞の増殖を抑制されたことを示したグラフである。

第21図は実施例7のオリゴヌクレオチド導入製剤をマウス平滑筋肉腫細胞(LMFS細胞)にin vitroで添加した場合に、対照例に比べてマウス平滑筋肉腫細胞内でのオルニチン脱炭酸酵素の産生が抑制されたことを示したグラフである。

発明を実施するための最良の形態

すなわち本発明は：

- (1)コラーゲンを必須成分とする標的細胞への所望のオリゴヌクレオチド導入製剤；
- (2)標的細胞が動物細胞である(1)記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；
- (3)標的細胞が対象疾患の治療を必要とする臓器あるいは組織またはその付近の細胞である(2)のオリゴヌクレオチド導入製剤；
- (4)コラーゲンがアテロコラーゲンである(1)～(3)のいずれかに記載のオリゴ

ヌクレオチド導入製剤；

(5)コラーゲンの分子量が約30万～約90万である(1)～(4)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(6)オリゴヌクレオチド導入製剤が持続性製剤である(1)～(5)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(7)オリゴヌクレオチドが5量体以上30量体以下の(1)～(6)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(8)オリゴヌクレオチドがDNAあるいはRNA誘導体である(6)または(7)記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(9)オリゴヌクレオチドがRNAあるいはRNA誘導体である(6)または(7)記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(10)DNA誘導体あるいはRNA誘導体が分子内に少なくとも1つ以上のホスホロチオエート結合を有する(8)または(9)記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(11)オリゴヌクレオチドが少なくともその一部が生体の恒常性を乱す生理的な効果を有するタンパク質をコードした遺伝子のセンス鎖あるいはアンチセンス鎖と生理的な条件下で相補的に結合する塩基配列を有する(1)～(10)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(12)オリゴヌクレオチドが少なくともその一部が病原性のウイルスあるいは細菌に特異的な遺伝子のセンス鎖あるいはアンチセンス鎖と生理的な条件下で相補的に結合する塩基配列を有する(1)～(10)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(13)オリゴヌクレオチドがメッセンジャーRNAの開始コドンを含む領域あるいは前駆メッセンジャーRNAがスプライシングを受ける部位に相補的な配列を有する(1)～(10)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(14)恒常性を乱す生理的な効果を有するタンパク質をコードした遺伝子ががん遺伝子である(11)記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(15)がん遺伝子が、増殖因子群、受容体型チロシンキナーゼ群、非受容体型チロシンキナーゼ群、GTP結合タンパク質、セリン・スレオニンキナーゼ群、転

写調節因子群の中から選ばれる(14)記載のオリゴスクレオチド導入製剤；
(16)がん遺伝子が $h\ s\ t - 1$ あるいはオルニチン脱炭酸酵素をコードする遺伝子である(14)記載のオリゴスクレオチド導入製剤；
(17)オリゴスクレオチドが、オリゴスクレオチドの細胞への導入を促進する物質または核への移行を促進する物質中に包含されているか、あるいは該物質と複合体を形成している(1)～(12)のいずれかに記載のオリゴスクレオチド導入製剤；
(18)細胞への導入を促進する物質がカチオン性リポソーム、膜融合型リポソームあるいはカチオン性のポリマーである(17)記載のオリゴスクレオチド導入製剤；
(19)コラーゲンが真皮由来の1型コラーゲンあるいは遺伝子工学的に生産される1型コラーゲンである(1)に記載のオリゴスクレオチド導入製剤；
(20)医学上許容される添加剤を更に含む(1)記載のオリゴスクレオチド導入製剤；
(21)添加剤が単糖、二糖、三糖以上のオリゴ糖またはそれぞれの糖アルコール、非疎水性アミノ酸類、カルボキシル基を2個以上有する有機酸類である(1)のオリゴスクレオチド導入製剤；
(22)溶液状、懸濁液状、スポンジ状、ペレット状または粉末状の形状を有する(1)記載のオリゴスクレオチド導入製剤；
(23)pH 4～8の溶液状または懸濁液状の(22)記載のオリゴスクレオチド導入製剤；
(24)コラーゲンの含量が0.001%～10%(w/w)の範囲である溶液状または懸濁液状の(22)記載のオリゴスクレオチド導入製剤；
(25)コラーゲンの含量が5～99%(w/w)の範囲であるスポンジ状、ペレット状または粉末状である(22)記載のオリゴスクレオチド導入製剤；
等に関する。

また本発明は、本発明のオリゴスクレオチド導入製剤を生体に投与することからなるがんのアンチセンス療法に、詳細には、所望のオリゴスクレオチドとコラーゲンを含むオリゴスクレオチド導入製剤を生体に例えれば、経皮、皮下、皮内、

筋肉、腹腔内、脳内、組織、血管内、口腔内、直腸内、消化管等に投与し、細胞に効率よく該オリゴヌクレオチドを導入することからなるアンチセンス療法に関する。

本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤、更に具体的には、オリゴヌクレオチド溶液をコラーゲン溶液(更に医療上許容される添加剤)と混合して得られた溶液あるいは懸濁液製剤は、

1) フィルム状、スポンジ状、粉末状、ミニペレット状等に目的に応じて成形が可能であり、

2) 該製剤を標的組織中あるいは近傍に投与後、製剤が投与部位に滞留し、

3) オリゴヌクレオチドがヌクレアーゼによる分解から保護され、

4) 製剤からオリゴヌクレオチドが徐放され、

5) 製剤からのオリゴヌクレオチドの放出速度を目的に応じて制御することが可能で

6) 標的組織近傍でオリゴヌクレオチド濃度を高濃度で維持し、

7) *in vivo*で副作用を誘発することなく標的m-RNAの発現を効果的に抑制し、かつ長期にその効果が維持されることを特徴とする。

更に本発明は、上記製剤を用いた感染症の治療および予防方法、あるいは特定の遺伝情報の過剰な発現によって誘起される諸疾患の治療および予防方法、特に癌の治療および予防方法に関する。

本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤は、オリゴヌクレオチド溶液とコラーゲン溶液を混合した溶液あるいは懸濁液そのものであるか、あるいはこれらの溶液あるいは懸濁液をフィルム状、スポンジ状、粉末状、ミニペレット状に成形したものであることから、本発明で使用するコラーゲンは、可溶性コラーゲンまたは可溶化コラーゲンを用いることが望ましい。

「可溶性コラーゲン」としては、酸性あるいは中性の水または塩を含有する水に可溶であるもの等が挙げられる。「可溶化コラーゲン」としては、例えは、酵素により可溶化される酵素可溶化コラーゲン、アルカリにより可溶化されるアルカリ可溶化コラーゲン等が挙げられる。

これらのコラーゲンは、孔サイズが1マイクロメートルのメンブレンフィルタ

ーを通過できることが望ましい。コラーゲンの可溶性はコラーゲンの架橋度に依存し、架橋度が高いほど不溶化することから、本発明に使用するコラーゲンの架橋度は、例えば、3量体以下であることが望ましく、より好ましくは2量体以下が望ましい。

5 コラーゲンの分子量は、例えば、約30万から90万が好ましく、約30万から約60万がより好ましい。

コラーゲンはいかなる動物種から抽出されたものまたはそれらの遺伝子組換体を用いることが出来る。好ましくは脊椎動物から抽出されたものまたはそれらの遺伝子組換体、更に好ましくは哺乳類、鳥類、魚類から抽出されたものまたはそれらの遺伝子組換体、より好ましくは変性温度が高い哺乳類、鳥類から抽出されたコラーゲンまたはそれらの遺伝子組換体が望ましい。コラーゲンのタイプもいかなるタイプのコラーゲンでも良いが、動物体内の存在量からI～V型またはそれらの遺伝子組換体が望ましい。

15 具体的には、例えば、哺乳動物の真皮から酸抽出した1型コラーゲンまたはそれらの遺伝子組換体が挙げられる。より望ましくは、例えば、仔牛の真皮から酸抽出した1型コラーゲン、遺伝子工学的に生産される1型コラーゲンなどが挙げられる。遺伝子工学的に生産される1型コラーゲンとしては仔牛の真皮由来またはヒトの真皮由来のものが好ましい。同じ1型コラーゲンでも腱由来のコラーゲンは架橋度が高く不溶性であるため適さない。

20 また、安全性の面から抗原性の高いテロペプチドを酵素的に除去したアテロコラーゲンあるいは遺伝子工学的に生産されるアテロコラーゲンが望ましく、1分子あたりチロシン残基が3以下であるアテロコラーゲンがより好ましい。

コラーゲンを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養物(培養上清、培養細胞)から分離精製して、得ることもできる。さらに、遺伝子工学的手法によりコラーゲンをコードする遺伝子を適切なベクターに組み込み、これを適切な宿主に挿入して形質転換し、この形質転換体の培養上清から目的とする組換えコラーゲンを得ることができる。上記宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、枯草菌、酵母、植物または動物細胞を用いることができる。

本発明に用いられるオリゴヌクレオチドは具体的には、例えば、5量体以上30量体以下のオリゴヌクレオチドであり、より具体的には例えば、1·5量体以上25量体以下のオリゴヌクレオチドである。

また、本発明に用いられるオリゴヌクレオチドは具体的には、例えば、DNA、
5 DNA誘導体、RNA、RNA誘導体等が挙げられ、より具体的には、例えば、
DNA誘導体、RNA誘導体等の分子内に少なくとも1つ以上のホスホロチオエ
ート結合を有するオリゴヌクレオチド等が挙げられる。

本発明に用いられるオリゴヌクレオチドは、さらに具体的には、例えば、少な
くともその一部が生体の恒常性を乱す生理的な効果を有するタンパク質をコード
10 した遺伝子、病原性のウイルス、細菌等に特異的な遺伝子のセンス鎖またはアン
チセンス鎖と生理的な条件下で相補的に結合する塩基配列等を有し、より具体的
には、病原性ウイルス、細菌等に特異的な遺伝子および恒常性を乱す生理的な効
果を有するタンパク質等をコードした遺伝子のメッセンジャーRNAと相補的に
結合する塩基配列を有する。

更に具体的には、本発明に用いられるオリゴヌクレオチドは、例えば、メッセンジャーRNAの開始コドンを含む領域あるいは前駆体メッセンジャーRNAが
スプライシングを受ける部位に相補的な配列等を有する。本発明に用いられるオリゴヌクレオチドの例を示せば、がんの治療あるいは予防に用いるオリゴヌクレオチドとしては、例えば、hst-1の発現を特異的に抑制する5'-CTCG
20 TAGGCGTTGTAGTTGT-3' (SEQ ID NO: 1)の配列を有したオリゴヌクレオチド、あるいはプロテインキナーゼC α の発現を特異的に抑制して非小細胞性肺がんや結腸がんなどの進行性がんに有効で、前立腺がん、乳がん、卵巣がん、肺臓がん、大腸がん、小細胞肺がんへの適用が試みられているISI53
521、C-rarfキナーゼの発現を特異的に抑制して前立腺がん、乳がん、卵巣がん、脳腫瘍、肺臓がん、大腸がん、小細胞肺がんへの適用が試みられている
25 ISI5132/CGP69846A、Harrasの発現を特異的に阻害して大腸がん、乳がん、脳腫瘍、肺臓がん、肺小細胞がんへの適用が試みられているISI5203、プロテインキナーゼAタイプIの発現を特異的に抑制するGEM231、DNAメチルトランスフェラーゼの発現を特異的に抑制するMG

98、c-mycの発現を抑制するINXC-6295、c-mybの発現を抑制し白血病への適用が検討されているINX-3001、bcl-2の発現を抑制して非ホジキンリンパ腫、大腸がん、小細胞肺がん、慢性リンパ性白血病、急性骨髓性白血病、乳がん、リンパ腫、メラノーマ、骨髄腫、非小細胞性肺がん、前立腺がんへの適用が検討されているG-3139(Genassense)、MD52蛋白の発現を抑制するオリゴヌクレオチド、VEGFの発現を抑制するオリゴヌクレオチドなどを挙げることができる。また、感染症の治療あるいは予防に用いるオリゴヌクレオチドとしては、HIVの増殖を抑制するGEM9.2、GPI-2A、サイトメガロウイルスの増殖を抑制するISIS2922(fomivirsen)、Vitravene、ISIS13312、GEM13.2、C型肝炎ウイルスの増殖を抑制するISIS14803などが挙げられ、炎症の治療に用いられるオリゴヌクレオチドとしては、ICAM-1の発現を特異的に抑制しクローン病、潰瘍性大腸炎、腎移植拒絶反応阻害、乾癬、喘息への適用が試みられているISIS2302、アデノシンA1レセプターの発現を抑制し、喘息への適用が試みられているEPI-2000、およびTNF- α 、CD49d(VLA-4)、VCAM-1、PECAM-1の発現を抑制するオリゴヌクレオチドなどが挙げられる。また、経皮経管冠動脈形成術後の再狭窄を防止するオリゴヌクレオチドとして、c-mycの発現を抑制するResen-NGなどが挙げられる。

恒常性を乱す生理的な効果を有するタンパク質をコードする遺伝子は具体的には、例えば、がん遺伝子とよばれる一群の遺伝子群が挙げられる。より具体的には、例えば、増殖因子群、受容体型チロシンキナーゼ群、非受容体型チロシンキナーゼ群、GTP結合タンパク質、セリン・スレオニンキナーゼ群、転写調節因子群などが挙げられる。更に具体的には、例えば、hst-1あるいはオルニチン脱炭酸酵素等をコードする遺伝子等が挙げられる。

本発明のオリゴヌクレオチドは、一般にオリゴヌクレオチドの細胞への導入を促進する物質または核への移行を促進する物質中に包含させるかあるいは該物質と複合体を形成させてもよい。前者の例として、カチオン性脂質、カチオン性ポリマー、疎水性ポリマー等を挙げることができる。「カチオン性脂質」として、

DOTMA (N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N-トリメチルアンモニウムクロライド)、DOSPA (2,3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スペルミンカルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート)、DDAB (ジメチルジオクタクレシルアンモニウムブロミド)、TM-TPS (N,N,N,N,N,N-テトラメチル-N,N',N",N"-テトラパルミチルスペルミン)、DMRIE (1,2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロミド)、N-(α -トリメチルアンモニウムアセチル)-ジドデシル-D-グルタメトクロライド (Biochemical Biophysical Research Communication, 196, 1042 (1994)) 等が挙げられ、これらのカチオン性脂質とDOPE (ジオレイルホスファチジルエタノールアミン) 等の中性脂質からなるカチオン性リポソーム、あるいはカチオン性脂質とコレステロールとの混合物も用いることができる。「カチオン性ポリマー」はオリゴヌクレオチドと静電的な相互作用をするポリマーであり、例えば DOGS (ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン) 等のリポポリアミン、A1k CWK 18 等のペプチド、ポリリジンやその誘導体 (Proceedings of Academy Sciences of the USA, 89, 6094 (1992)) 等のカチオン性ポリアミノ酸およびその誘導体、ポリエチレンイミン、ポリアミンデンドリマー等が挙げられる。「疎水性ポリマー」は遺伝子と疎水的な相互作用をするポリマーであり、例えばポリビニルアルコールやポリビニルピロリドン等が挙げられる。その他、A1k CWK 18 等のペプチドも用いることができる。

上記カチオン性リポソームとしては、例えば、DOSPAとDOPEを1:1で含むLIPOFECTAMINE (登録商標、Life Technologies, Inc., ロックビル, MD, USA)、DOTMAとDOPEを1:1で含むリポソーム、DDABとDOPEを1:2.5で含むLIPOFECTACE (登録商標、Life Technologies, Inc., ロックビル, MD, USA)、TM-TPSとDOPEを1:1.5で含むCELLFECTIN (登録商標、Life Technologies, Inc., ロックビル, MD, USA) 等を挙げることができるが、これらに限定されない。また、上記カチオン性脂質とコレステロールの混合物とは、例えばDMRIEとコレステロールのモル比で1:1の混合物であるDMRIE-C (Life

Technologies, Inc., ロックビル, MD, U S A)を挙げることができる。

オリゴヌクレオチドは膜融合型リポソーム中に包含されてもよくあるいはリポソームと複合体を形成してもよい。膜融合型リポソームとしては例えばHIV J-リポソーム等が挙げられる。

5 遺伝子の核への移行を促進する物質としては、HMG-1および2の混合物 (high mobility group-1, 2 mixture: 実験医学, 12, 184 (1994))等を挙げることができる。

10 本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤中のコラーゲンとオリゴヌクレオチドの量比は、コラーゲンによる、1)ヌクレアーゼあるいは他のタンパク質からのオリゴヌクレオチドの保護、2)オリゴヌクレオチドの徐放、3)オリゴヌクレオチドの局所滞留およびそれによる局所での高濃度維持、4)オリゴヌクレオチドの細胞内への導入促進、を達成する上で重要である。コラーゲンとオリゴヌクレオチドの量比は、オリゴヌクレオチドの鎖長が目的に応じて如何よりも選択できることから、コラーゲン1分子に対するオリゴヌクレオチドの負電荷の数により表すことが出来る。本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤において望ましいコラーゲン1分子に対するオリゴヌクレオチドの負電荷の数は10～5000であり、望ましくは10～2500、より望ましくは10～1000である。

15 本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤は、オリゴヌクレオチドとコラーゲンに加えて医学上許容される添加剤を更に含むことができる。

20 具体的には、これらの添加剤は溶液状あるいは懸濁液状のオリゴヌクレオチド導入製剤のpHを調整する目的で用いられる塩類、アミノ酸類およびアミン類、あるいは高粘度の溶液状、懸濁液状あるいはスポンジ状、フィルム状、円柱状および粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤からオリゴヌクレオチドの放出を制御する効果を有する添加剤である。塩類、アミノ酸類、アミン類としては、例えば、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、クエン酸ナトリウム、クエン酸二水素ナトリウム、リン酸三ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、無水リン酸一ナトリウム、無水リン酸二水素ナトリウム、リジン、アルギニンなどが挙げられる。

25 放出を制御する効果を有する添加剤としては、具体的には、例えば、単糖、二糖、三糖以上のオリゴ糖もしくはこれらの糖アルコールまたはこれらの誘導体、

アミノ酸類、カルボキシル基を2個以上有する有機酸類、ゼラチン、アルブミン、フィブリン、アルギン酸、アガロース、アラビアゴムなどである。

単糖としては、例えば、グルコース、ガラクトース、フルクトース等が挙げられ、好ましくはグルコースである。二糖としては、例えば、シュークロース、マルトース、ラクトース、トレハロースなどが挙げられる。

糖アルコールとしては、例えば、ソルビトール、マンニトール等が挙げられ、好ましくはソルビトールである。

糖誘導体には、例えば、デオキシ糖、アミノ糖、リン酸エステル類およびこれらを構成成分とする二糖などがある。

アミノ酸類としては、医学的に許容されるアミノ酸およびその塩、ならびにこれらの誘導体などが挙げられる。アミノ酸類としては、例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸などの酸性アミノ酸、リジン、アルギニン、ヒスチジンなどの塩基性アミノ酸、グリシン、アラニン、メチオニン、プロリン、シスチン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、イソロイシン、システイン、チロシン、トリプトファン、ロイシンなどが挙げられる。本発明におけるアミノ酸類とは、他に塩基性あるいは中性の側鎖が存在しているアミノ酸も含まれる。アミノ酸の塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩などが挙げられる。

カルボキシル基を2個以上有する有機酸およびその塩としては、好ましくは、例えばカルボキシル基を2あるいは3個含む有機酸およびその塩が挙げられ、より好ましくは飽和または不飽和脂肪族の該有機酸などが挙げられる。カルボキシ基を2あるいは3個含む有機酸およびその塩として、例えばクエン酸、酒石酸、コハク酸、リンゴ酸、フマル酸およびその塩などが挙げられ、好ましくは例えば、クエン酸、酒石酸塩およびその塩などが挙げられる。あるいは、オリゴヌクレオチドの細胞内におけるエンドソームでの分解を抑えるために、例えばエンドソームの内容物を放出する能力を有する不活化したアデノウイルス、CHEMS(コレステロールヘミスクシネートモルホリン塩)等を用いることもできる。

本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤には、上記の糖類、アミノ酸類およびカルボキシル基を2個以上有する有機酸類のいずれかを含有する製剤およびこれらのうち任意の2者または3者を含有する製剤が含まれる。

添加剤を用いて放出を制御する場合には、その添加剤の含有量で調節することができる。例えば放出時間を長くするには添加剤の含有量を下げ、短くするには添加剤の含有量を高くする。添加剤の量は、具体的にはコラーゲンに対し、0～約19800w/w%の範囲から選択できる。好ましい範囲としては約0～約1890w/w%の範囲が挙げられる。より好ましくは約0～約900w/w%の範囲が挙げられる。更に好ましくは約0～300w/w%の範囲が挙げられる。

本発明のオリゴスクレオチド導入製剤は、溶液状あるいは懸濁液状であるか、あるいは溶液状あるいは懸濁液状の形態を経てスポンジ状、円柱状あるいは粉末状に加工されたものである。溶液状あるいは懸濁液状の、本発明のオリゴスクレオチド導入製剤のpHは4～8の範囲であり、コラーゲンを0.001%～10%(w/w)含有し、好ましくは0.1%～5%(w/w)含有する。スポンジ状、ペレット状あるいは粉末状のオリゴスクレオチド導入製剤は5～99%(w/w)、好ましくは10～70%(w/w)、より好ましくは25～50%(w/w)のコラーゲンを含有する。

本発明のオリゴスクレオチド導入製剤は、例えば、経皮、皮下、皮内、筋肉、脳内、組織、血管内投与することができる。投与回数は3日から約2ヶ月に1回、好ましくは、1週間から1ヶ月に一回である。

本発明のオリゴスクレオチド導入製剤の投与量は、溶液状あるいは懸濁液状の製剤の場合にはその液量で、スポンジ状製剤の場合には製剤の大きさで、円柱状製剤の場合は径と長さで、さらに粉末状製剤の場合は粉体体積あるいは重量で容易に調節することができる。また、製剤中のオリゴスクレオチド含有量によっても投与量を調節できる。

本発明のオリゴスクレオチド導入製剤の最適な投与量は、適応疾患、投与部位、投与方法、剤形の種類、患者の性別、年齢、症状などによって異なるが、製剤中のオリゴスクレオチド量としては、治療対象に対して例えば、0.001mg/kg～40mg/kg、好ましくは0.01mg/kg～30mg/kgである。

溶液状あるいは懸濁液状の、本発明のオリゴスクレオチド導入製剤の製造方法としては、例えば、

1)コラーゲン溶液に、所望のオリゴスクレオチド溶液を加えて混合し、これに

必要に応じて添加剤を溶解し、均一な溶液状のオリゴスクレオチド導入製剤あるいは懸濁液状のオリゴスクレオチド導入製剤を得る方法；

2) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴスクレオチド溶液を加えて混合し、均一な溶液状のオリゴスクレオチド導入製剤あるいは懸濁液状のオリゴスクレオチド導入製剤を得る方法；

3) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴスクレオチド溶液を加えて混合し、均一な溶液状オリゴスクレオチド導入製剤あるいは懸濁液状のオリゴスクレオチド導入製剤を得る方法；

4) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴスクレオチド溶液に溶解させ、均一な溶液状オリゴスクレオチド導入製剤あるいは懸濁液状のオリゴスクレオチド導入製剤を得る方法；

5) コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴスクレオチド溶液に溶解させ、均一な溶液状オリゴスクレオチド導入製剤あるいは懸濁液状のオリゴスクレオチド導入製剤を得る方法；

15 6) 所望のオリゴスクレオチド溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に溶解させ、均一な溶液状オリゴスクレオチド導入製剤あるいは懸濁液状のオリゴスクレオチド導入製剤を得る方法；

7) 必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴスクレオチド溶液を乾燥し、得られた乾燥品をコラーゲン溶液に溶解させ、均一な溶液状オリゴスクレオチド導入製剤あるいは懸濁液状のオリゴスクレオチド導入製剤を得る方法；

20 などが挙げられる。この時、溶液状の製剤を得るか、懸濁液状の製剤を得るかはオリゴスクレオチド溶液およびコラーゲン溶液の各々の濃度によって調節する。

フィルム状のオリゴスクレオチド導入製剤の製造方法としては、例えば

25 1) コラーゲン溶液に、所望のオリゴスクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要に応じて添加剤を溶解し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を徐々に乾燥させてフィルム状のオリゴスクレオチド導入製剤を得る方法；

2) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴスクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を徐々に乾燥させてフィルム状のオリゴスクレオチド導入製剤を得る方法；

3) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を徐々に乾燥させてフィルム状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

4) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を徐々に乾燥させてフィルム状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

5) 10 コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を徐々に乾燥させてフィルム状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

6) 所望のオリゴヌクレオチド溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を徐々に乾燥させてフィルム状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

7) 必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を乾燥し、得られた乾燥品をコラーゲン溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を徐々に乾燥させてフィルム状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；などが挙げられる。

スponジ状のオリゴヌクレオチド導入製剤の製造方法としては、例えば、

1) コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要に応じて添加剤を溶解し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥してスponジ状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

2) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥してスponジ状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

3) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥してスponジ状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

20 4) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥してスponジ状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

5) コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥してスポンジ状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；などが挙げられる。

5 粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤の製造方法としては、例えば、

1) コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要に応じて添加剤を溶解し、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

10 2) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

3) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

15 4) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

5) コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

20 6) コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要に応じて添加剤を溶解し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉碎して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

7) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉碎して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

25 8) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉碎して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

9) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉碎して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

5 10) コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉碎して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

10 11) コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要に応じて添加剤を溶解し、得られた懸濁液をろ過して得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

12) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた懸濁液をろ過して得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

15 13) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた懸濁液をろ過して得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

14) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた懸濁液をろ過して得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

20 15) コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた懸濁液をろ過して得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

25 16) 所望のオリゴヌクレオチド溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に溶解させ、得られた懸濁液をろ過して得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

17) 必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を乾燥し、得られた乾燥品をコラーゲン溶液に溶解させ、得られた懸濁液をろ過して得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；など

5 が挙げられる。

円柱状のオリゴヌクレオチド導入製剤の製造方法としては、例えば、

1) コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要に応じて添加剤を溶解し、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

10 2) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

3) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

15 4) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

5) コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

20 6) コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要に応じて添加剤を溶解し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉碎して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

25 7) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉碎して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

8) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥し、得ら

れたスポンジを粉碎して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

9) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉碎して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

10) コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉碎して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

11) コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要に応じて添加剤を溶解し、得られた懸濁液をろ過して得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

12) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた懸濁液をろ過して得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

13) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた懸濁液をろ過して得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

14) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた懸濁液をろ過し、得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

15) コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた懸濁液をろ過し、得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

16) 所望のオリゴヌクレオチド溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に溶解させ、得られた懸濁液をろ過し、得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方

法；

17) 必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を乾燥し、得られた乾燥品をコラーゲン溶液に溶解させ、得られた懸濁液をろ過し、得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

18) コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要に応じて添加剤を溶解し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥して得たスポンジを円柱状に圧縮成形する方法；

19) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥してして得たスポンジを円柱状に圧縮成形する方法；

20) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥して得たスポンジを円柱状に圧縮成形する方法；

21) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥して得たスポンジを円柱状に圧縮成形する方法；

22) コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥して得たスポンジを円柱状に圧縮成形する方法；

23) コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要に応じて添加剤を溶解し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥して得たスポンジに水等を加えた後、練合し、ノズルから円柱状に押し出し、乾燥する方法；

24) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥して得たスポンジに水等を加えた後、練合し、ノズルから円柱状に押し出し、乾燥する方法；

25) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオ

チド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥して得たスポンジに水等を加えた後、練合し、ノズルから円柱状に押し出し、乾燥する方法；

26)必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥して得たスポンジに水等を加えた後、練合し、ノズルから円柱状に押し出し、乾燥する方法；

27)コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させて、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥して得たスポンジに水等を加えた後、練合し、ノズルから円柱状に押し出し、乾燥する方法；

28)コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要に応じて添加剤を溶解し、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して得た粉末に水等を加えた後、練合し、ノズルから円柱状に押し出し、乾燥する方法；

29)必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して得た粉末に水等を加えた後、練合し、ノズルから円柱状に押し出し、乾燥する方法；

30)コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して得た粉末に水等を加えた後、練合し、ノズルから円柱状に押し出し、乾燥する方法；

31)必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品に所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えた後、練合し、ノズルから円柱状に押し出し、乾燥する方法；

32)コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に加えた後、練合し、ノズルから円柱状に押し出し、乾燥する方法；など

が挙げられる。

実施例

以下に実施例および試験例を挙げて本発明を詳しく説明するが、本発明はこれ

ら実施例および試験例により限定されるものではない。

実施例 1

線維芽細胞増殖因子H S T - 1 (F G F 4)の遺伝子(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2890-2984 (1987)に記載)の4 1 9 6 b から 4 2 1 6 b までの配列に相補的な配列を有したホスホチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチド(5' - C T C G T A G G C G T T G T A G T T G T - 3' (SEQ ID NO: 1); 分子量: 約 6 5 0 0) (サワデー株式会社)を最終濃度 1.0 マイクロモル/L の濃度となるようにアテロコラーゲンの中性溶液((株)高研製アテロコラーゲンインプラント: 2%アテロコラーゲン溶液)と混合し、アテロコラーゲン最終濃度が 0.5% の溶液状のオリゴヌクレオチド導入製剤を調製した。

実施例 2

オルニチン脱炭酸酵素遺伝子の3 1 9 b から 3 3 8 b までの配列に相補的な配列を有したホスホチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチド(A S - O D C, 5' - T C A T G A T T C T T G A T G T T C C - 3') (SEQ ID NO: 2) (エスペックオリゴサービス株式会社)を終濃度 0.5、1、1.5、2、2.5 ミリモル/L の濃度となるようにアテロコラーゲンの中性溶液((株)高研製アテロコラーゲンインプラント: 3.5 w/w%アテロコラーゲン溶液、終濃度 1.75 w/w%)と混合し、溶液状のオリゴヌクレオチド導入製剤を調製した。

実施例 3

A S - O D C を終濃度 1.0 ミリモル/L の濃度となるようにアテロコラーゲンの中性溶液((株)高研製アテロコラーゲンインプラント: 3.5 w/w%アテロコラーゲン溶液、終濃度 1.75 w/w%) 0.5 マイクロL とトランスファスト (Promega) 1.5 マイクロL を混合し、リポソームを含有したオリゴヌクレオチド導入製剤を調製した。

実施例 4

実施例 1 で調製した溶液状のオリゴヌクレオチド導入製剤 3 mL をポリスチレン製のシャーレー(直径 3.5 mm) 上に流し込み、これをシリカゲルを入れたデシケーター中で水平に保って 5 °C で静置して徐々に乾燥し、コラーゲン 1 mg あたり 3.2.5 マイクログラムのオリゴヌクレオチドを含むフィルム状のオリゴヌク

レオチド導入製剤を得る。

実施例 5

実施例 1 で調製した溶液状のオリゴヌクレオチド導入製剤 3 mL をポリスチレンシャーレ(直径 35 mm) 上に流し込み、これを -40 °C で凍結させた後、陰圧下室温で一晩乾燥し、コラーゲン 1 mgあたり 32.5 マイクログラムのオリゴヌクレオチドを含むスポンジ状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る。

実施例 6

2 w/w% アテロコラーゲン溶液(17.5 g)に水(52.5 g)、10 mg/mL のグルコース溶液(10 mL)を加えて混合した後、5 mg/mL のホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチド(5'-CTCGTAGGCGTTGTTAGTTGT-3' (SEQ ID NO: 1); 分子量: 約 6500) 溶液(10 mL)を加えて混合する。得られた溶液を -40 °C で凍結させた後、陰圧下室温で一晩乾燥し、この凍結乾燥品に適量の蒸留水を加えて練合する。その後、練合品をノズルを通して棒状に押し出し成形し、さらに乾燥させて棒状の製剤を得る。すなわち 10 mgあたり 1 mg のオリゴヌクレオチドを含有する棒状の遺伝子製剤を得る。

実施例 7

オルニチン脱炭酸酵素遺伝子の 319 b から 338 b までの配列に相補的な配列を有したホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチド(AS-ODC、5'-TCATGATTTCTTGATGTTCC-3') (SEQ ID NO: 2) (エスペックオリゴサービス株式会社)を 10 ミリグラム/ミリリットル含有する生理食塩水 50 マイクロリットルとアテロコラーゲン液(3.5%) 50 マイクロリットルを室温で混合し、AS-ODC を 5 マイクログラム/マイクロリットル、アテロコラーゲンを 1.75% 含有する溶液状態のオリゴヌクレオチド導入製剤を調製した。

参考例 1

アテロコラーゲンの中性溶液を蒸留水に変えた以外は、実施例 1 に記載の操作に従い、ホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチド溶液を調製した。

参考例 2

線維芽細胞増殖因子 HST-1 (FGF4) の遺伝子 (Proc. Natl. Acad. Sci.

USA, 84, 2890-2984 (1987)に記載)の4196bから4216bまでの配列に相補的な配列を有したホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドの変わりに、その配列と同じ配列を有したホスホロチオエート型センスオリゴヌクレオチド(5'-ACAACTACAAACGCC TACGAG-3')(SEQ ID NO: 3)

5 を用いた以外は、実施例1に記載の操作に従い溶液状の組成物を得た。

参考例3

線維芽細胞増殖因子H S T - 1 (F G F 4)の遺伝子(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2890-2984 (1987)に記載)の4196bから4216bまでの配列に相補的な配列を有したホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチド(5'-CTCGTAGGCGTTGTAGTTGT-3')(SEQ ID NO: 1);分子量: 約6500)を20マイクロモル/Lの濃度になるように溶解したリン酸緩衝液500マイクロLと、リポフェクトアミン(G I B C O B R L)25マイクロLを溶解したリン酸緩衝液500マイクロLを混合し、室温で20分間、静置反応することで最終濃度10マイクロモル/Lのオリゴヌクレオチド・リポソーム製剤を得た。

参考例4

A S - O D C の変わりにリン酸緩衝液を加えた以外は、実施例2に記載の操作に従いアテロコラーゲンを1.75w/w%含有するアテロコラーゲン溶液を調製した。

参考例5

アテロコラーゲンの中性溶液をリン酸緩衝液に変えた以外は、実施例2に記載の操作に従いA S - O D C を1.0ミリモル/Lの濃度で含有したホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチド溶液を調製した。

参考例6

25 A S - O D C の変わりに、非相同な配列を有したホスホロチオエート型スクランブルオリゴヌクレオチド(5'-AGTACTAAAGAACTACAAGG-3')(SEQ ID NO: 4)(エスペックオリゴサービス株式会社)を1.0ミリモル/Lの濃度で含有する以外は、実施例2に記載の操作に従い溶液状のホスホロチオエート型スクランブルオリゴヌクレオチド組成物を得た。

参考例 7

A S - O D C を終濃度 1.0 ミリモル/L となるように、リン酸緩衝液と、トランシスファスト (Promega) を溶解したリン酸緩衝液 1.5 マイクロL を混合することでリポソーム製剤を得た。

5 試験例 1

実施例 1 で調製したオリゴヌクレオチド導入製剤 2 マイクロL を 20 % の仔牛血清を含む P B S (−) 液 100 マイクロL に混合し 37 °C で静置した。混合後、30 分、60 分、180 分後に混合液を分取して 3 % アガロースゲル電気泳動に付し、製剤中のホスホチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドの一次構造を評価した。結果を第 1 図に示す。実施例 1 で調製したオリゴヌクレオチド導入製剤中のホスホチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドは、20 % の仔牛血清を含む P B S (−) 溶液と混合した 180 分後でも無処理のホスホチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドの泳動位置にバンドが認められたのに比べて、参考例 1 の製剤では 30 分後にはバンドは確認できなかった。この結果は、本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤中でホスホチオエート型オリゴヌクレオチドが酵素による分解から保護されることを示している。

10 試験例 2

10 週齢のオスのヌードマウスの精巣に H S T - 1 を産生するヒト精巣胚腫瘍細胞 (NEC-8) を 10×10^5 個移植した。移植 10 日後に実施例 1 で調製したオリゴヌクレオチド導入製剤をヌードマウスの精巣あたり 50 マイクロリットルを投与した。投与後、10 日後、20 日後、30 日後にヌードマウスを屠殺し、精巣中の腫瘍細胞の重量を測定した。結果を第 2 図に示す。ヌードマウスの精巣中の精巣胚腫瘍細胞の増殖は、参考例 2 のゲル状の組成物および参考例 3 のリポソームの組成物をそれぞれ精巣あたり 50 マイクロリットル投与した場合に比べて、実施例 1 で調製したオリゴヌクレオチド導入製剤を投与したヌードマウスで最も抑制された。特に、参考例 3 のリポソーム製剤では 20 日後まで実施例 1 のオリゴヌクレオチド導入製剤と同等の抑制効果を示したが、30 日後には増殖抑制効果は見られなかった。この結果は、本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤が投与後ヌードマウスの精巣に滞留し、ヌードマウスの体内で H S T - 1 の產生

を抑制するホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドを酵素による分解から保護し、このホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドを局所で徐放することによって効果的にかつ長期間腫瘍細胞の増殖を抑制する効果を有することを示している。

5 試験例 3

10 %牛胎児血清を含むDMEM培地 500 マイクロL 中で培養したヒト胃癌細胞(MKN 45 細胞)(財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 5×10^5 個に実施例 2 で調製した溶液状のオリゴヌクレオチド導入製剤(AS-ODC を 1.0 ミリモル/L 含有する) 5 マイクロL を添加(終濃度 1.0 マイクロモル/L) し、
10 37 °C で培養した。添加 24 時間後にオリゴヌクレオチド導入製剤を含む培地を新鮮な培地と交換し、その後 24 時間毎に培地を交換して 6 日間培養した。添加後 2 日毎に細胞数を 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT アッセイ)により測定した。同様に参考例 4 で調製したアテロコラーゲン溶液、参考例 5 で調製したホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチド溶液、参考例 6 で調製した溶液状のホスホロチオエート型スクランブルオリゴヌクレオチド組成物を MKN 45 細胞に添加して細胞数を測定した。結果を第 3 図に示す。実施例 2 の溶液状のオリゴヌクレオチド導入製剤を添加した場合、何も添加しなかった対照群に比べて MKN 45 細胞の増殖が著しく抑制された。更に 6 日後には添加時に比べて MKN 45 細胞数が減少した。
20 一方、アテロコラーゲン溶液である参考例 4、AS-ODC のみを含有する参考例 5、ホスホロチオエート型スクランブルオリゴヌクレオチドとアテロコラーゲンを含む参考例 6 の製剤を添加した場合には、対照群に比べて MKN 45 細胞の増殖は抑制されたものの、実施例 2 の製剤を添加した場合に比べて抑制効果は低かった。これらの結果はホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドによる腫瘍細胞の増殖抑制効果は、アテロコラーゲンと混合して本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤とすることによって増強されること、また本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤による腫瘍細胞の増殖抑制機構が単にアテロコラーゲンあるいはホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドが標的細胞と共存することに由来せず、ホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドによる標的細胞

の増殖抑制効果および殺細胞効果に因ることを示している。

試験例 4

10 %牛胎児血清を含むDMEM培地 500 マイクロL 中で培養したヒト横紋筋肉腫細胞 (RD 細胞) (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 5×10^5 個に実施例 2 で調製した溶液状のオリゴヌクレオチド導入製剤 (AS-ODC を 0.5, 5
1、1.5、2、2.5 ミリモル/L 含有する) 5 マイクロL を添加 (終濃度 5、10、15、20、25 マイクロモル/L) し、37°C で培養した。添加 24 時間後にオリゴヌクレオチド導入製剤を含む培地を新鮮な培地と交換し、その後 24 時間毎に培地を交換して 5 日間培養した。添加後 1、35 日後に細胞の生存率を 10
トリパンブルー染色法により測定した。結果を第 4 図に示した。測定したすべてのオリゴヌクレオチド導入製剤で RD 細胞の生存率は低下し、測定した中で最も AS-ODC 濃度が低い 5 マイクロモル/L のオリゴヌクレオチド導入製剤でも殺細胞効果が見られた。

試験例 5

15 10 %牛胎児血清を含むDMEM培地 500 マイクロL 中で培養したヒト横紋筋肉腫細胞 (RD 細胞) 5×10^5 個に実施例 3 で調製したリポソームを含有したオリゴヌクレオチド導入製剤 5 マイクロL を添加し、37°C で培養した。添加 24 時間後にオリゴヌクレオチド導入製剤を含む培地を新鮮な培地と交換し、その後 24 時間毎に培地を交換して 8 日間培養した。添加 2、4、6、8 日後に細胞の生存率をトリパンブルー染色法により測定した。また、添加 2、4、6 日後に RD 細胞内のオルニチン脱炭酸酵素活性を測定した。同様に参考例 7 のリポソーム製剤を添加して RD 細胞の生存率および細胞内のオルニチン脱炭酸酵素の活性を調べた。結果を第 5 図と第 6 図に示した。実施例 3 のリポソームを含有したオリゴヌクレオチド導入製剤、参考例 7 のリポソーム製剤共に RD 細胞の生存率を 20 低下させたが、オリゴヌクレオチド導入製剤の方が強い殺細胞効果を示した。また、同様にリポソームを含有したオリゴヌクレオチド導入製剤とリポソーム製剤は共に RD 細胞内のオルニチン脱炭酸酵素活性を低下させたが、オリゴヌクレオチド導入製剤の方が強く活性を低下させた。これは実施例 3 のリポソームを含んだオリゴヌクレオチド導入製剤が、参考例 7 のリポソーム製剤に比べて強く標的

遺伝子であるオルニチン脱炭酸酵素遺伝子の発現を抑制し、RD細胞を減少させたことを示している。これらの結果は本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤がリポソームを含んだ場合でも、ホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドによる殺細胞効果を増強し、その増強効果が従来のリポソーム製剤に比べて優れていることを示している。
5

試験例 6

4 週齢のオスのヌードマウスの背部皮下にオルニチン脱炭酸酵素を過剰に產生する RD 細胞を 5×10^7 個移植した。移植 7 日後に実施例 7 で調製したオリゴヌクレオチド導入製剤を RD 細胞移植部位、RD 細胞を移植した対側の背部筋肉内、および腹腔内にそれぞれ投与した。同様に参考例 4 のアテロコラーゲン溶液、参考例 7 のリポソーム製剤およびリン酸緩衝液(対照群)をそれぞれ RD 細胞移植部位に投与した。投与後、7 日毎にヌードマウスを屠殺し、RD 細胞の重量を測定した。結果を第 7 図、第 8 図、および第 9 図に示す。第 7 図は実施例 7 の製剤および参考例 4 の製剤の RD 移植部位投与した場合の比較、第 8 図は実施例 10
15
15 の製剤および参考例 7 の製剤を RD 移植部位投与した場合の比較、第 9 図は実施例 7 の製剤の RD 移植部位投与(局注)、筋肉内投与(筋注)および腹腔内投与(腹注)の結果を示す。ヌードマウス背部筋肉中の RD 細胞の増殖は、参考例 4 のアテロコラーゲン溶液(第 7 図)、参考例 7 のリポソーム製剤(第 8 図)およびリン酸緩衝液を投与した場合に比べて、実施例 7 で調製したオリゴヌクレオチド導入製剤を RD 移植部位内、RD 細胞を移植した対側の背部筋肉内、および腹腔内に投与したすべてのヌードマウスで最も抑制された(第 9 図)。特に、参考例 7 のリポソーム製剤では 7 日後まで実施例 7 のオリゴヌクレオチド導入製剤と同等の抑制効果を示したが、14 日後には増殖抑制効果は見られなかった。これらは本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤がリポソーム製剤に比べてより強力に RD 細胞の増殖を抑制すること、またこの RD 細胞の増殖抑制効果が長期に亘って持続すること、更に増殖抑制効果が投与部位による影響を受けないことを示している。この結果は本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤が、投与後ヌードマウスの体内でホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドを酵素による分解から保護し、このホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドを徐放することによって効果
20
25

的にかつ長期間腫瘍細胞の増殖を抑制する効果を有することを示している。第10図および第11図にRDを移植したヌードマウスの累積生存曲線を示した。第10図は、実施例7の製剤と参考例4の製剤をRD移植部位投与した場合の比較、第11図は実施例7の製剤と参考例7の製剤をRD移植部位投与した場合の比較を示す。実施例7のオリゴヌクレオチド導入製剤をRD移植部位に投与したマウスの平均生存日数は52.6日で、リン酸緩衝液を投与したヌードマウスの平均生存日数20.5日、参考例4のアテロコラーゲン溶液を投与したヌードマウスの平均生存日数40.3日(第10図)、参考例7のリポソーム製剤を投与したヌードマウスの平均生存日数37.8日(第11図)に比べて大幅に延長された。この結果は本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤を投与して得られるRD細胞の増殖抑制効果が、RD細胞を移植したヌードマウスの延命率を高めることを示している。また、第12図および第13図に実施例7のオリゴヌクレオチド導入製剤、参考例4のアテロコラーゲン溶液、参考例7のリポソーム製剤およびリン酸緩衝液投与後42日のRD細胞内でのオルニチン脱炭酸酵素活性を示した。第12図は実施例7の製剤と参考例4の製剤をRD移植部位に投与した場合の比較、第13図は実施例7の製剤と参考例7の製剤をRD移植部位投与した場合の比較を示す。オリゴヌクレオチド導入製剤を投与したRD細胞内のオルニチン脱炭酸酵素活性は、アテロコラーゲン溶液、リポソーム製剤およびリン酸緩衝液を投与したRD細胞に比べて低かった。これはオリゴヌクレオチド導入製剤を投与することによってオルニチン脱炭酸酵素の産生が抑制されていることを示しており、オリゴヌクレオチド導入製剤を投与した場合にみられたRD細胞の増殖抑制効果が、オリゴヌクレオチド導入製剤中に含まれるホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドによるオルニチン脱炭酸酵素遺伝子の発現抑制によるものであることを示している。

25 試験例7

4週齢のオスのヌードマウスの背部皮下にオルニチン脱炭酸酵素を過剰に産生するMKN45細胞を 5×10^7 個移植した。移植7日後に実施例7で調製したオリゴヌクレオチド導入製剤をMKN45細胞移植部位に投与した。同様に参考例4のアテロコラーゲン溶液、参考例6の溶液状のホスホロチオエート型スクラ

ンブルオリゴヌクレオチド組成物およびリン酸緩衝液(対照群)をそれぞれMKN 4 5 細胞移植部位に投与した。投与後、7日毎にヌードマウスを屠殺し、MKN 4 5 細胞の重量を測定した。結果を第14図に示す。ヌードマウス背部筋肉中のMKN 4 5 細胞の増殖は、参考例4のアテロコラーゲン溶液、参考例6の溶液状のホスホロチオエート型スクランブルオリゴヌクレオチド組成物およびリン酸緩衝液を投与した場合に比べて、実施例7で調製したオリゴヌクレオチド導入製剤をMKN 4 5 細胞移植部位に投与した場合に最も抑制された。これは本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤がMKN 4 5 細胞の増殖を抑制すること、またこのMKN 4 5 細胞の増殖抑制効果が長期に亘って持続することを示している。第15図にMKN細胞を移植したヌードマウスの累積生存曲線を示した。実施例7のオリゴヌクレオチド導入製剤をMKN細胞移植部位に投与したヌードマウスの平均生存日数は48.5日で、参考例4のアテロコラーゲン溶液を投与したヌードマウスの平均生存日数39.1日、参考例6の溶液状のホスホロチオエート型スクランブルオリゴヌクレオチド組成物を投与したヌードマウスの平均生存日数39.1日、リン酸緩衝液を投与したヌードマウスの平均生存日数21.3日に比べて大幅に延長された。この結果は本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤を投与して得られるMKN細胞の増殖抑制効果が、MKN細胞を移植したヌードマウスの延命率を高めることを示している。また、第16図に実施例7のオリゴヌクレオチド導入製剤、参考例4のアテロコラーゲン溶液、参考例6の溶液状のホスホロチオエート型スクランブルオリゴヌクレオチド組成物およびリン酸緩衝液投与後35日のMKN 4 5 細胞内のオルニチン脱炭酸酵素活性を示した。オリゴヌクレオチド導入製剤を投与したMKN 4 5 細胞内のオルニチン脱炭酸酵素活性は、アテロコラーゲン溶液、溶液状のホスホロチオエート型スクランブルオリゴヌクレオチド組成物およびリン酸緩衝液を投与したMKN 4 5 細胞に比べて顕著に低かった。これはオリゴヌクレオチド導入製剤を投与することによってオルニチン脱炭酸酵素の産生が抑制されていることを示しており、オリゴヌクレオチド導入製剤を投与した場合にみられたMKN 4 5 細胞の増殖抑制効果が、オリゴヌクレオチド導入製剤中に含まれるホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドによるオルニチン脱炭酸酵素遺伝子の発現抑制によるものであることを示している。

試験例 8

4 週齢のオスのヌードマウスの背部皮下にオルニチン脱炭酸酵素を過剰に產生するヒト大腸癌細胞(COLO 201細胞)(財団法人ヒューマンサイエンス振興財団)を 5×10^7 個移植した。移植 7 日後に実施例 7 で調製したオリゴヌクレオチド導入製剤を COLO 201 細胞移植部位に投与した。同様に参考例 4 で調製したアテロコラーゲン溶液およびリン酸緩衝液(対照群)をそれぞれ COLO 201 細胞移植部位に投与した。投与後、7 日毎にヌードマウスを屠殺し、COLO 201 細胞の重量を測定した。結果を第 17 図に示す。ヌードマウス背部筋肉中での COLO 201 細胞の増殖は、参考例 4 のアテロコラーゲン溶液およびリン酸緩衝液を投与した場合に比べて、実施例 7 で調製したオリゴヌクレオチド導入製剤を投与した場合に最も抑制され、かつ COLO 201 細胞の重量は移植時より減少した。これらは本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤が COLO 201 の増殖を抑制すると共に COLO 201 細胞を死滅させること、またこの COLO 201 細胞の増殖抑制効果が長期に亘って持続することを示している。第 18 図に COLO 201 細胞を移植したヌードマウスの累積生存曲線を示した。実施例 7 のオリゴヌクレオチド導入製剤を COLO 201 細胞移植部位に投与したマウスの平均生存日数は 39.8 日で、アテロコラーゲン溶液およびリン酸緩衝液を投与したヌードマウスのそれぞれの平均生存日数 31.2 日および 20.6 日に比べて延長された。この結果は本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤を投与して得られる COLO 201 の増殖抑制効果が、COLO 201 を移植したヌードマウスの延命率を高めることを示している。また、第 19 図に実施例 7 のオリゴヌクレオチド導入製剤、参考例 4 のアテロコラーゲン溶液およびリン酸緩衝液投与後 35 日の COLO 201 細胞内でのオルニチン脱炭酸酵素活性を示した。オリゴヌクレオチド導入製剤を投与した COLO 201 細胞内のオルニチン脱炭酸酵素活性は、アテロコラーゲン溶液およびリン酸緩衝液を投与した COLO 201 細胞に比べて低かった。これはオリゴヌクレオチド導入製剤を投与することによってオルニチン脱炭酸酵素の產生が抑制されていることを示しており、この結果はオリゴヌクレオチド導入製剤を投与した場合にみられた COLO 201 細胞の増殖抑制効果が、オリゴヌクレオチド導入製剤中に含まれるホスホロチオエート

型オリゴヌクレオチドによるオルニチン脱炭酸酵素遺伝子の発現抑制によるものであることを示している。

試験例 9

10 %牛胎児血清を含むD M E M 培地 0.5 m L 中で培養したマウス平滑筋肉
5 腫細胞 (L M F S 細胞) 1×10^5 個に実施例 7 で調製した溶液状のオリゴヌクレ
オチド製剤 (100 マイクロモル / L の A S - O D C と 0.175 % の A S - O D
C を含有する) 10 マイクロ L を添加し、37 °C で培養した。添加 24 時間後に
オリゴヌクレオチド製剤を含む培地を新鮮な培地と交換し、その後 24 時間毎に
培地を交換して 6 日間培養した。添加後 2 日毎に細胞数とオルニチン脱炭酸酵素
10 活性を測定した。結果をそれぞれ第 20 図、第 21 図に示す。実施例 7 の溶液状
のオリゴヌクレオチド製剤を添加した場合、何も添加しなかった対照群に比べて
L M F S 細胞の増殖が著しく抑制され、オルニチン脱炭酸酵素活性も低下した。
この結果は本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤が増殖性、転移性共に極めて強
い L M F S 細胞の増殖を標的塩基配列特異的に抑制できることを示している。

15 産業上の利用の可能性

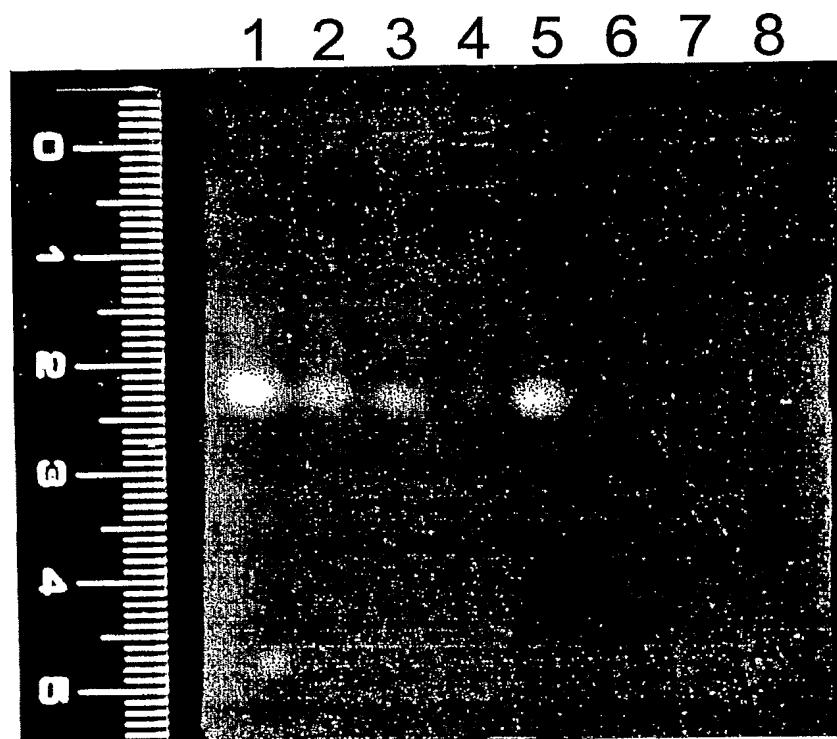
標的 m - R N A と相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとコラーゲン
(更に医療上許容される添加剤) からなる製剤が、 i n v i v o で副作用を誘発
することなく標的 m - R N A の発現を効果的に抑制し、かつ長期にその効果が維
持されることにより、遺伝子治療が可能となった。

請求の範囲

1. コラーゲンを必須成分とする標的細胞への所望のオリゴヌクレオチド導入製剤。
- 5 2. 標的細胞が動物細胞である請求項1記載のオリゴヌクレオチド導入製剤。
3. 標的細胞が治療を必要とする臓器あるいは組織またはその付近の細胞である請求項2記載のオリゴヌクレオチド導入製剤。
4. コラーゲンがアテロコラーゲンである請求項1～3のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド導入製剤。
- 10 5. コラーゲンの分子量が約30万～約90万である請求項1～4のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド導入製剤。
6. 持続性製剤である請求項1～5のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド導入製剤。
- 15 7. オリゴヌクレオチドが5量体以上30量体以下の請求項1～6のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド導入製剤。
8. オリゴヌクレオチドがDNAあるいはDNA誘導体である請求項6または7記載のオリゴヌクレオチド導入製剤。
9. オリゴヌクレオチドがRNAあるいはRNA誘導体である請求項6または7記載のオリゴヌクレオチド導入製剤。
- 20 10. DNA誘導体あるいはRNA誘導体が分子内に少なくとも1つ以上のホスホロチオエート結合を有する請求項8または9記載のオリゴヌクレオチド導入製剤。

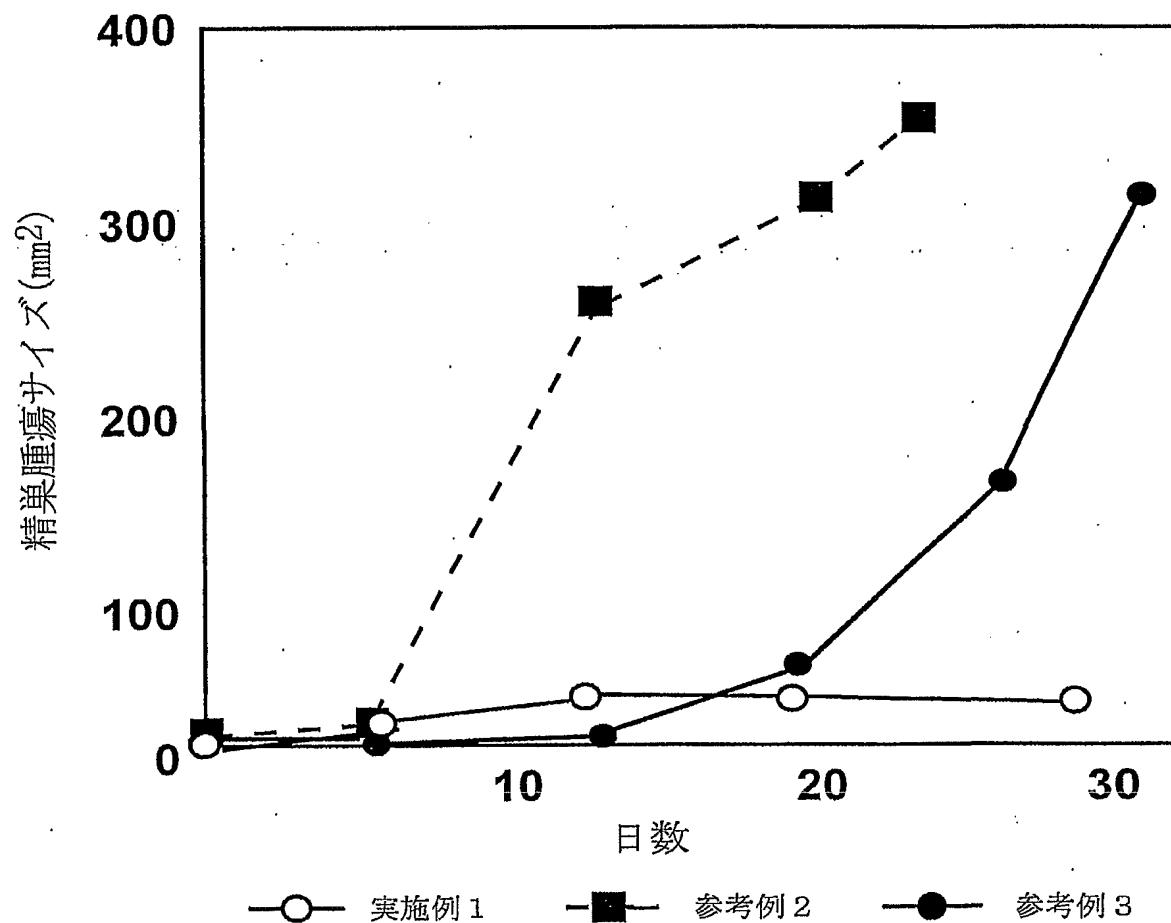
1/19

第1図



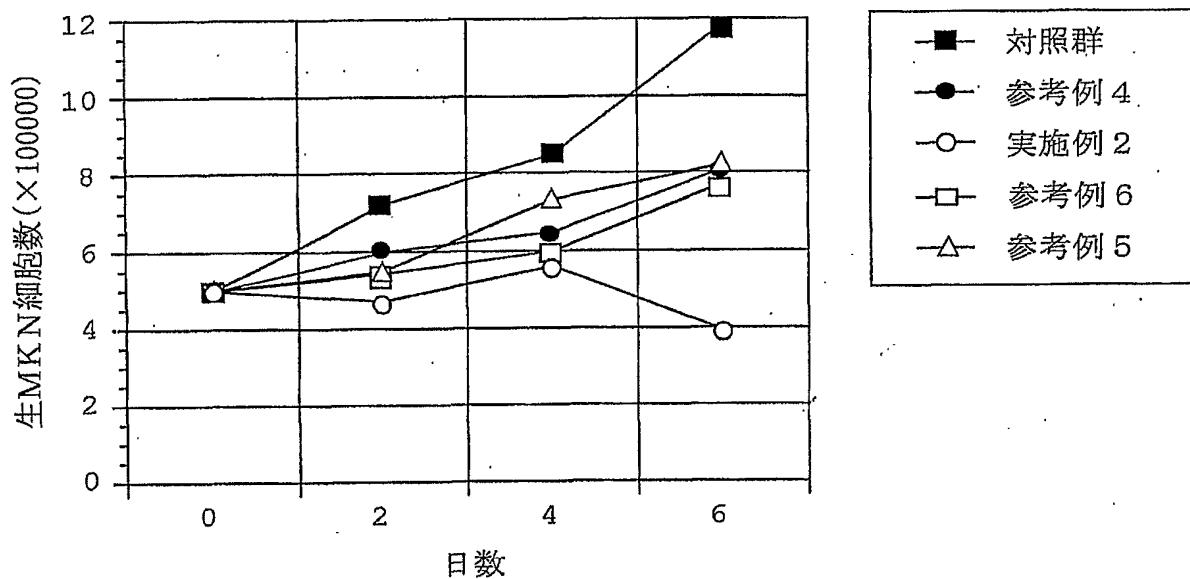
2/19

第2図



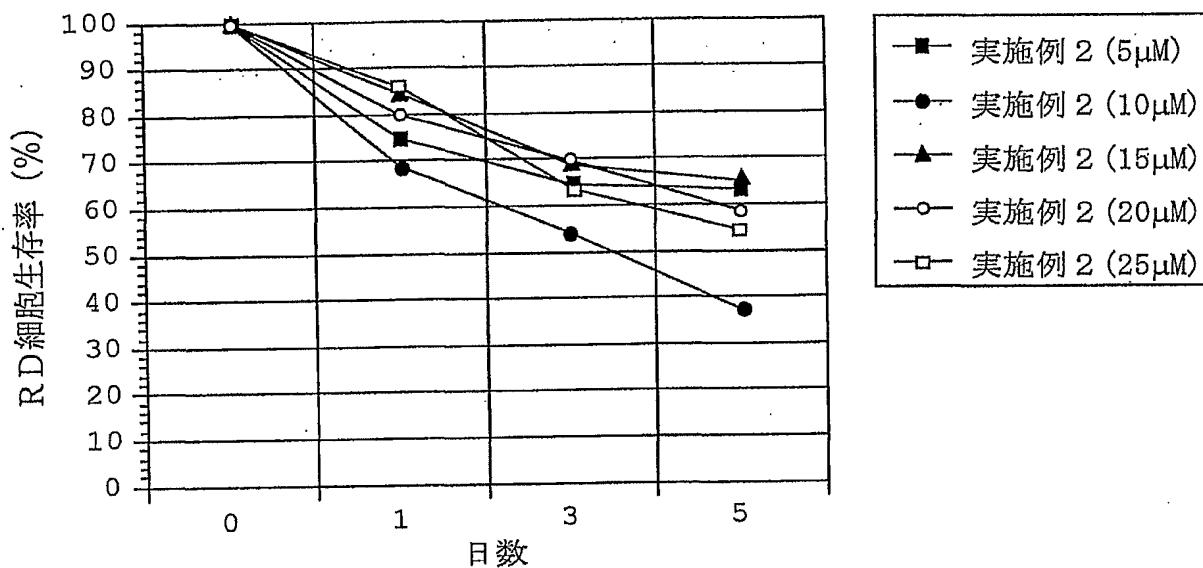
3 / 19

第3図



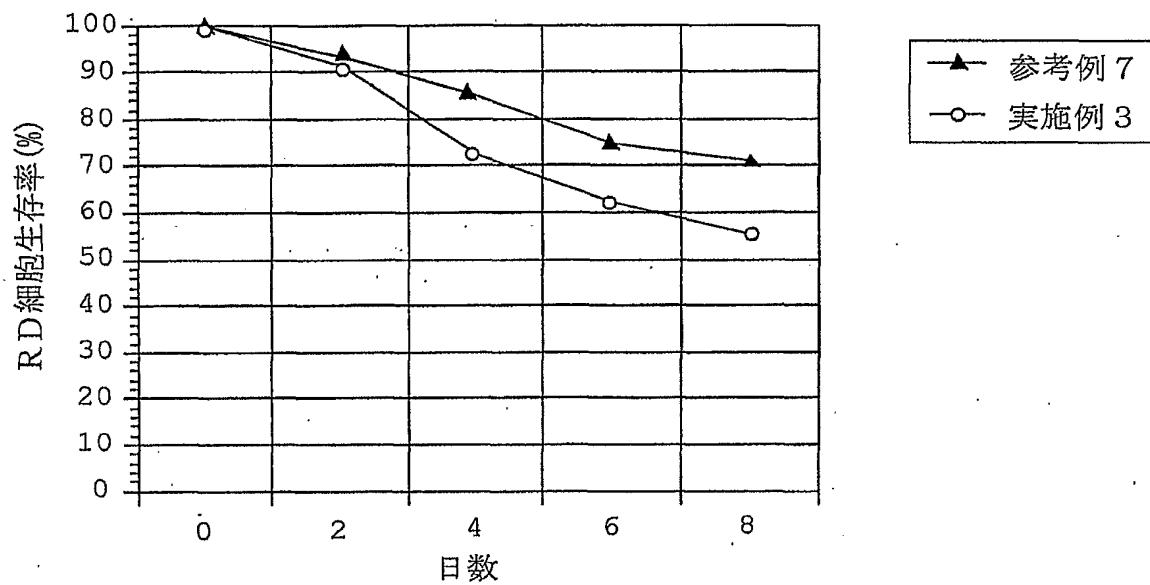
4/19

第4図



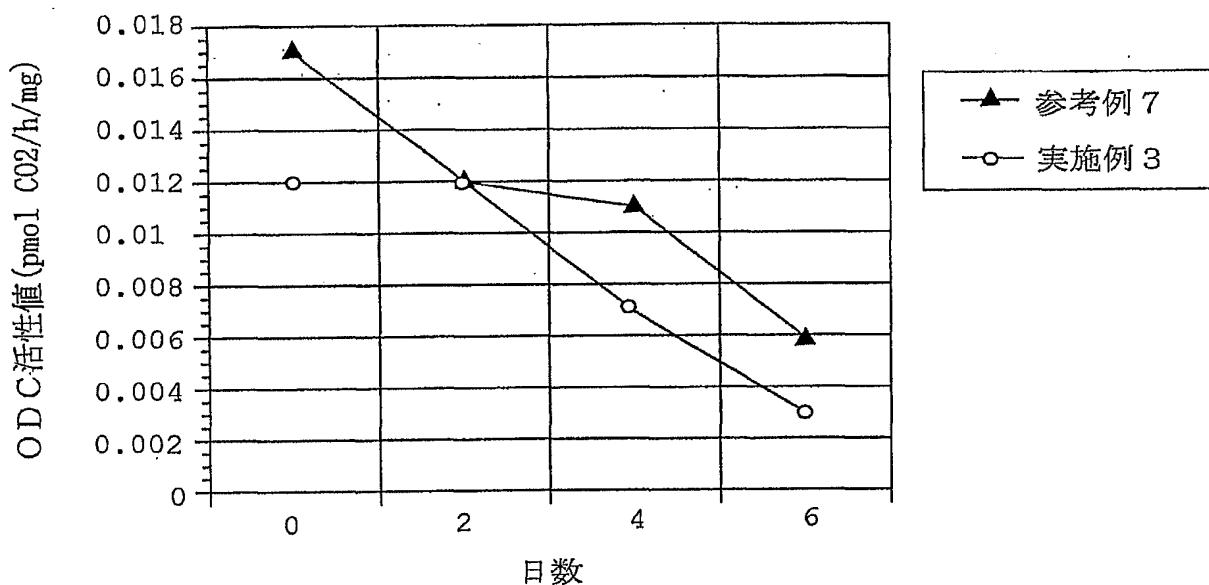
5/19

第5図



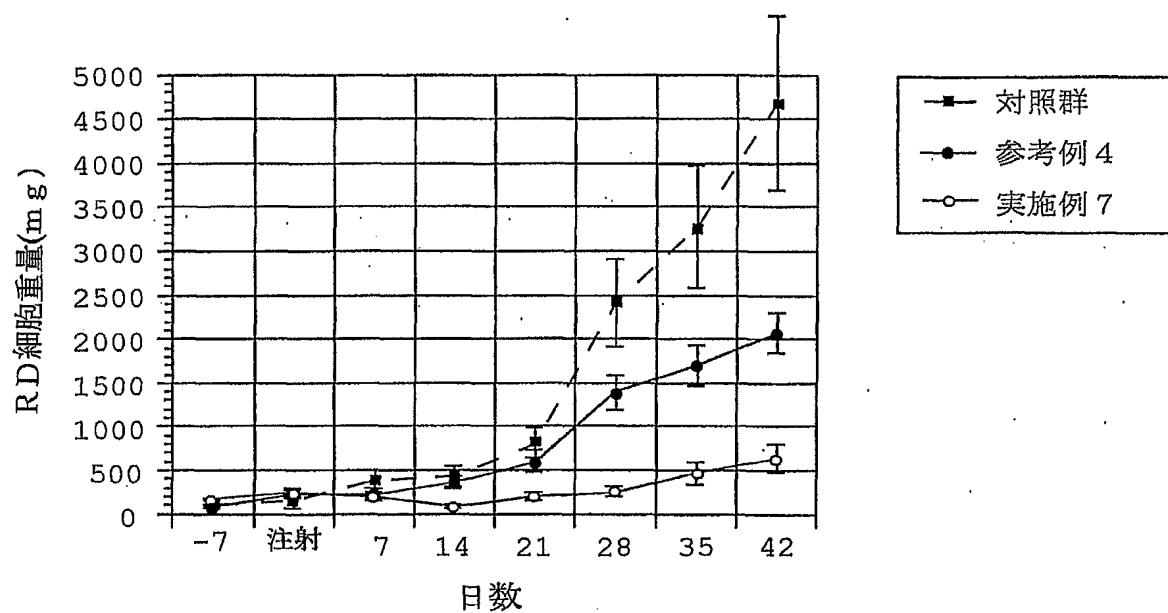
6/19

第6図



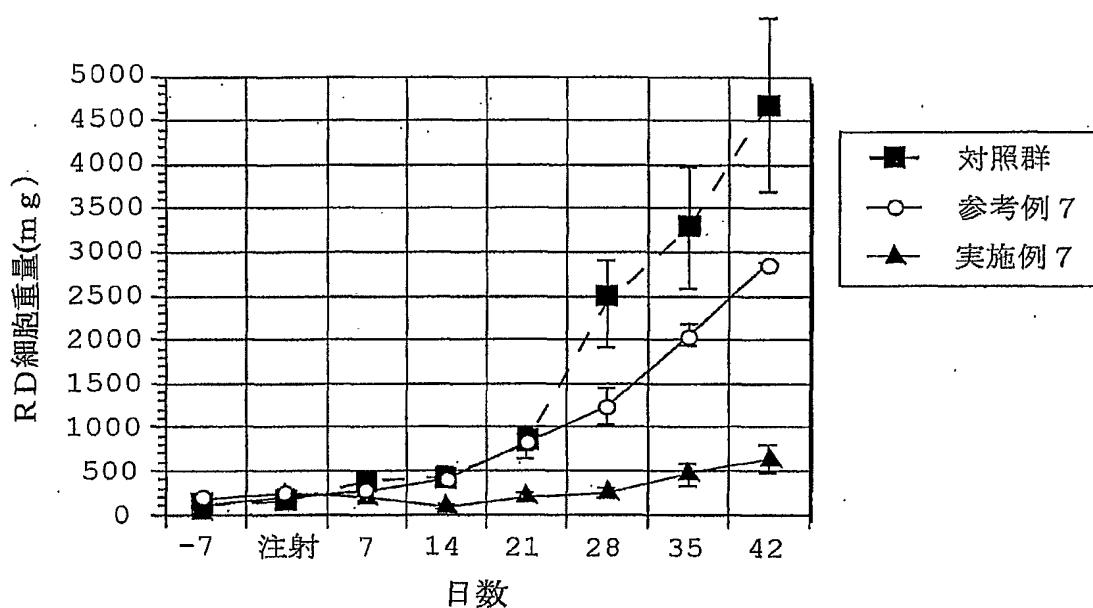
7/19

第7図



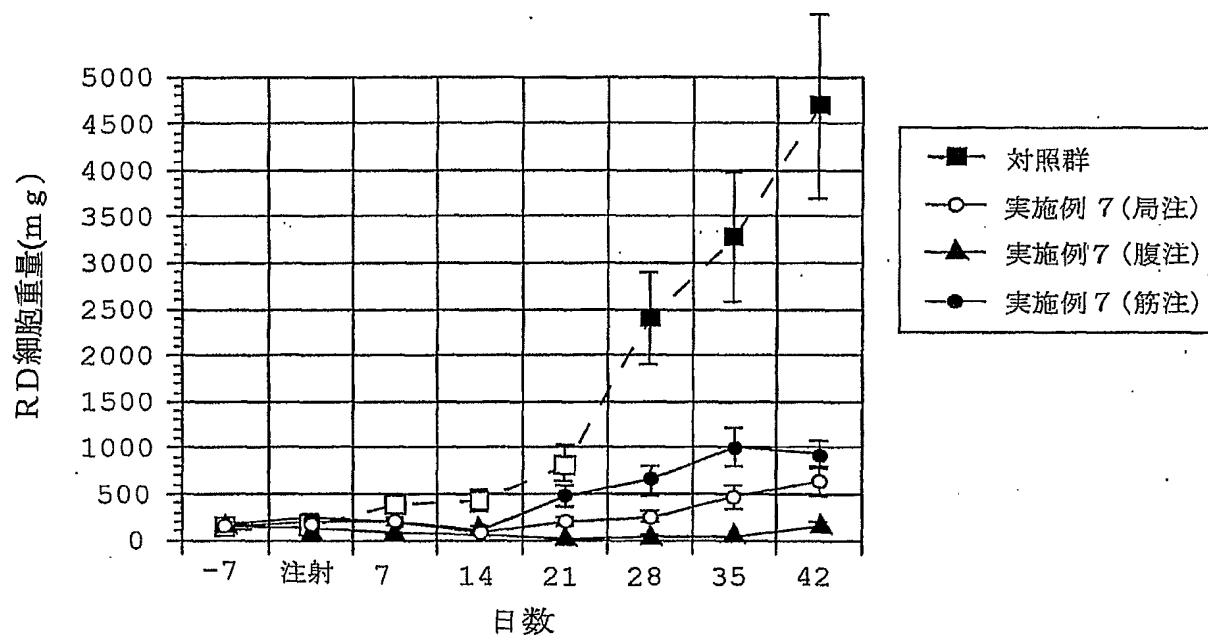
8/19

第8図



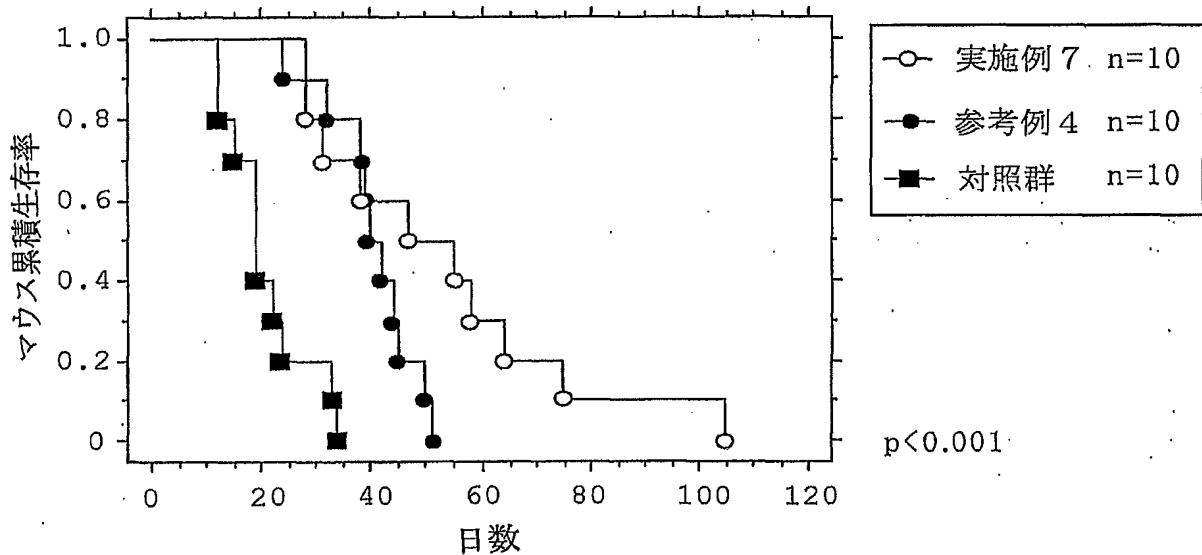
9/19

第9図



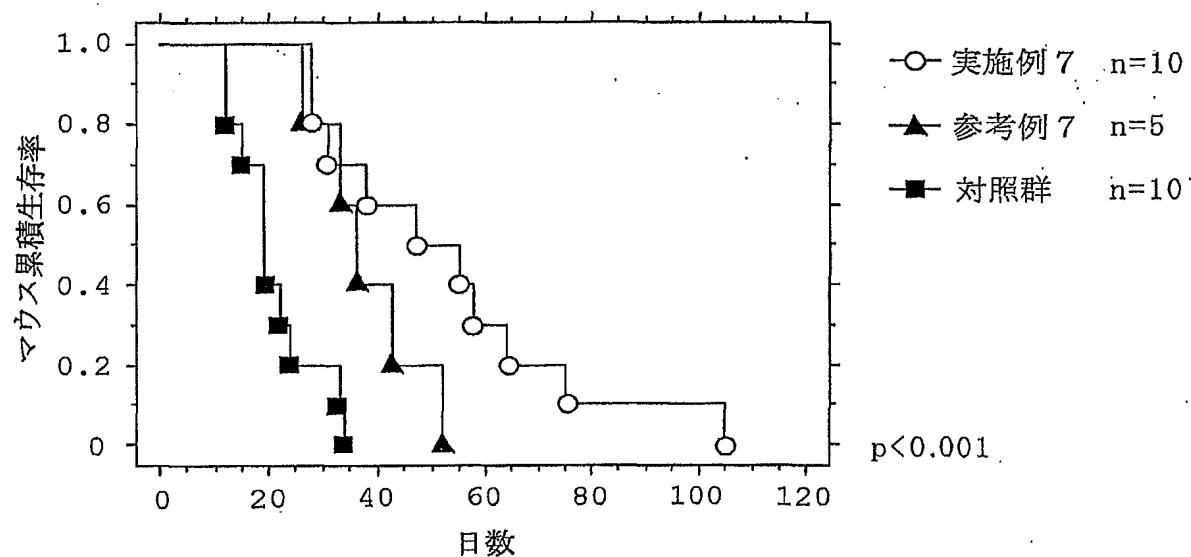
10/19

第10図



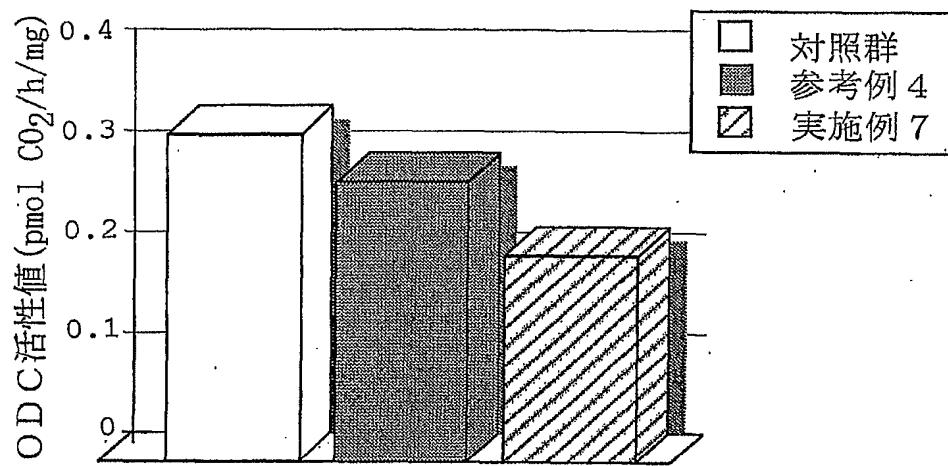
11/19

第11図

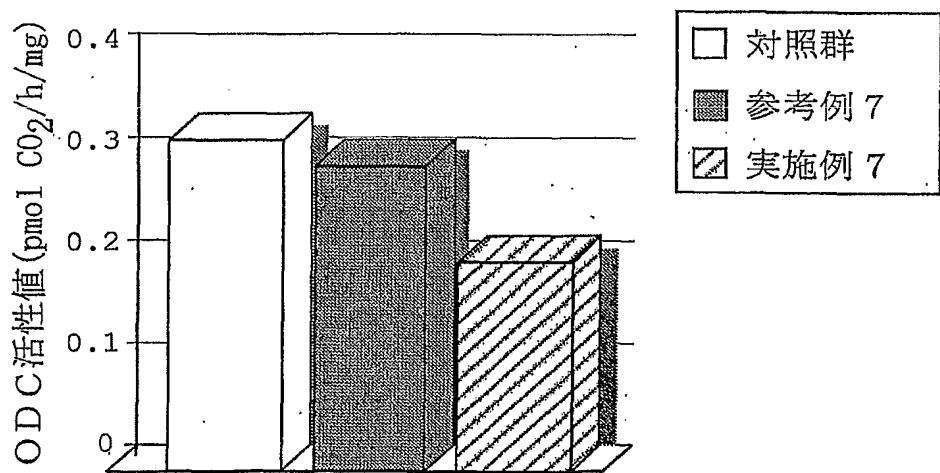


12/19

第12図

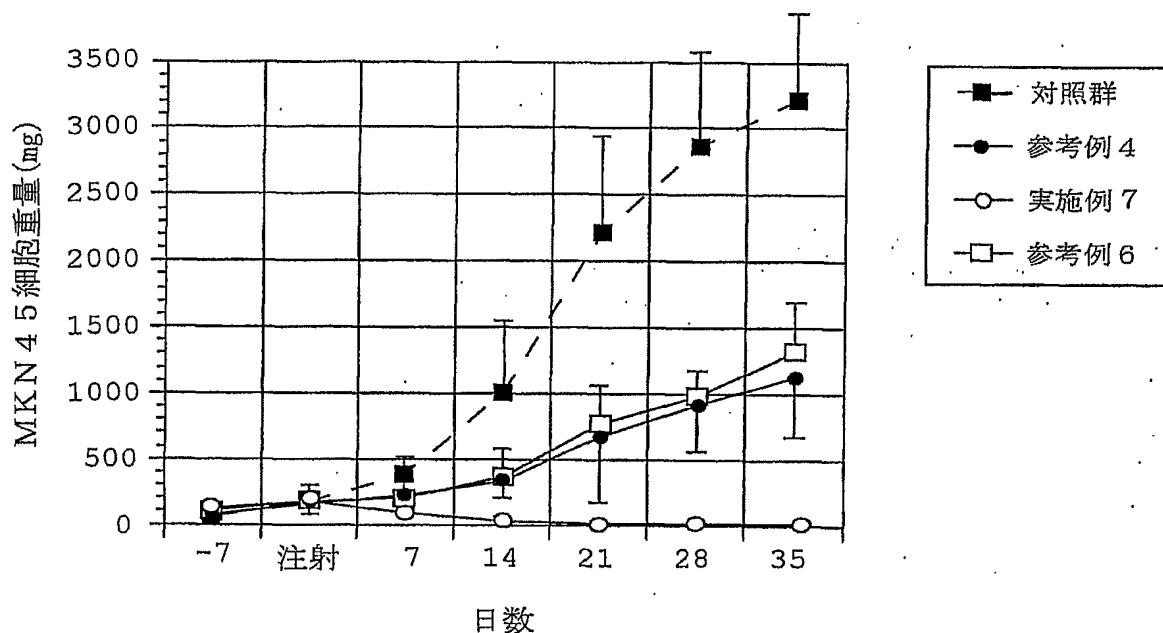


第13図



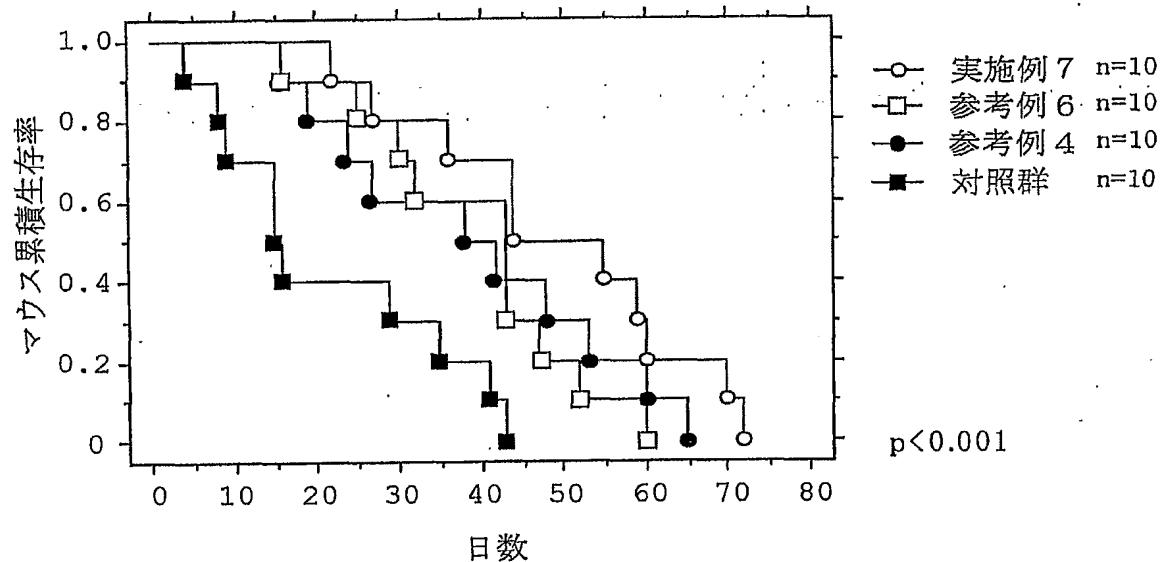
13/19

第14図



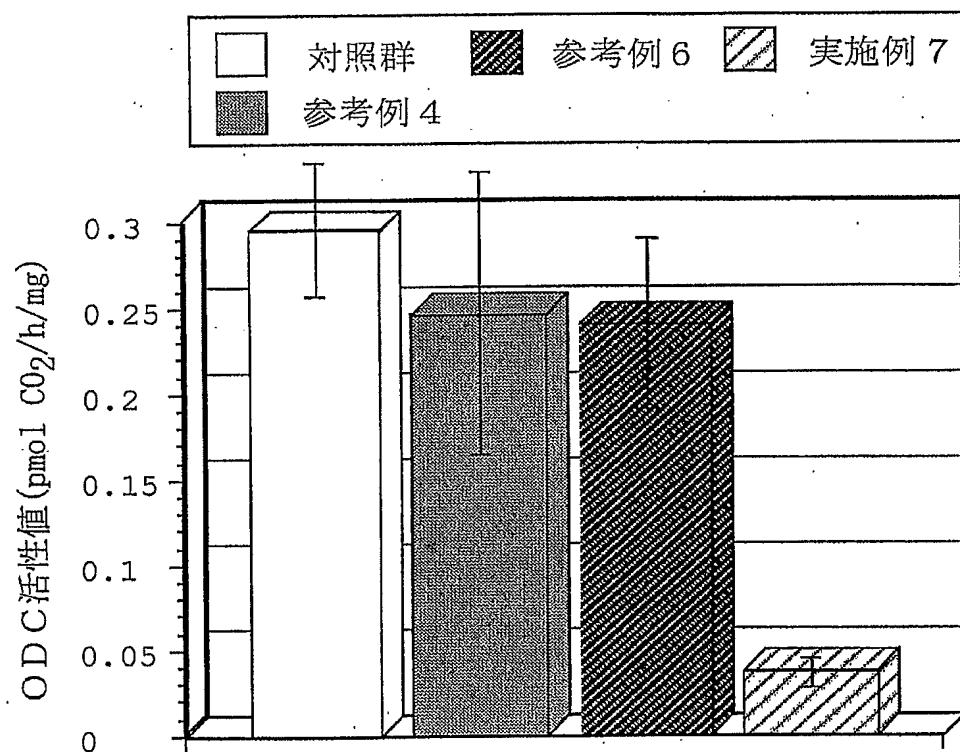
14/19

第 15 図



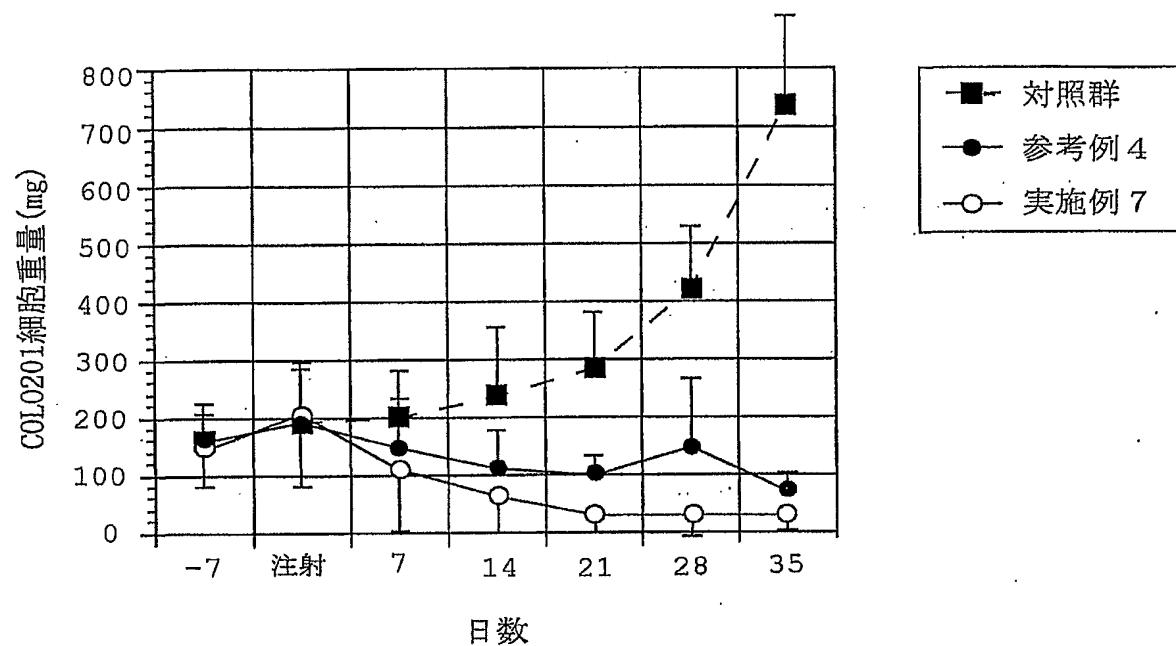
15/19

第16図



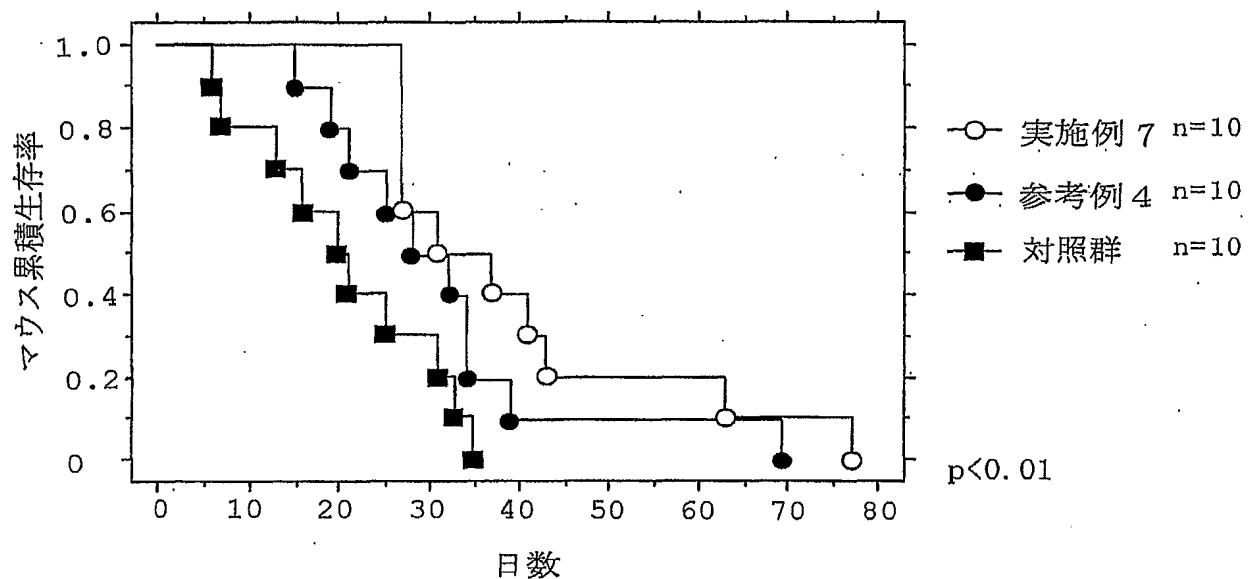
16/19

第17図



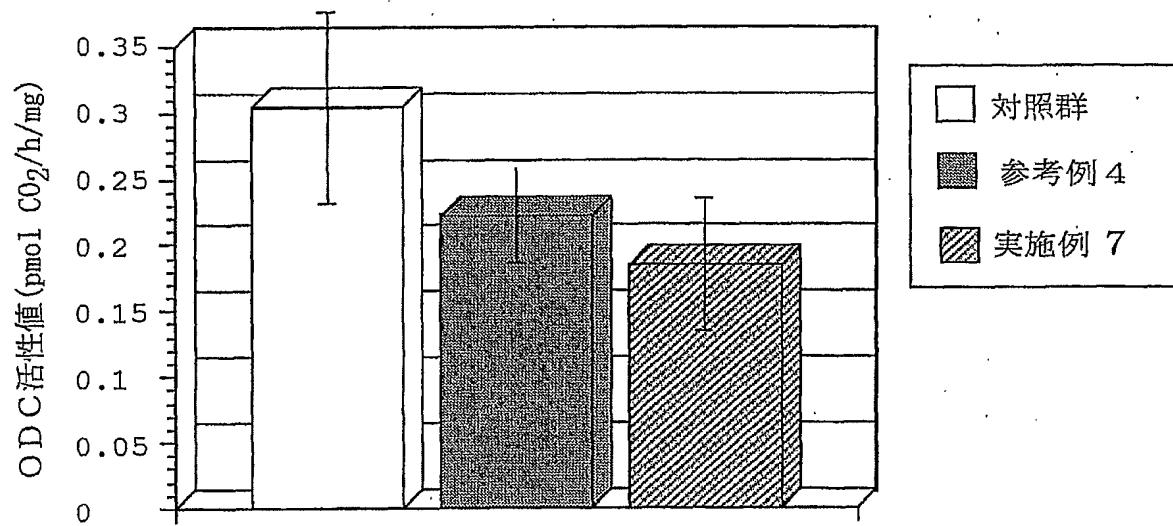
17/19

第18図



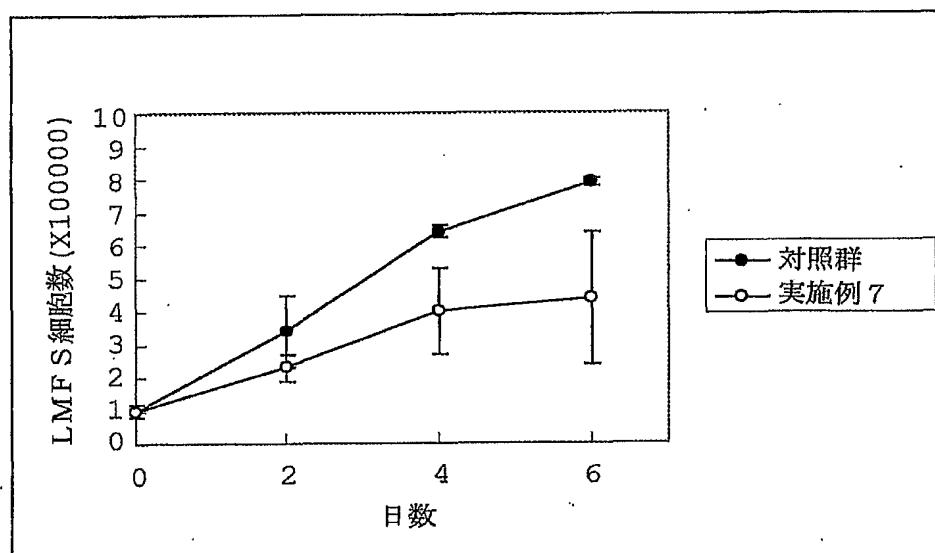
18/19

第19図

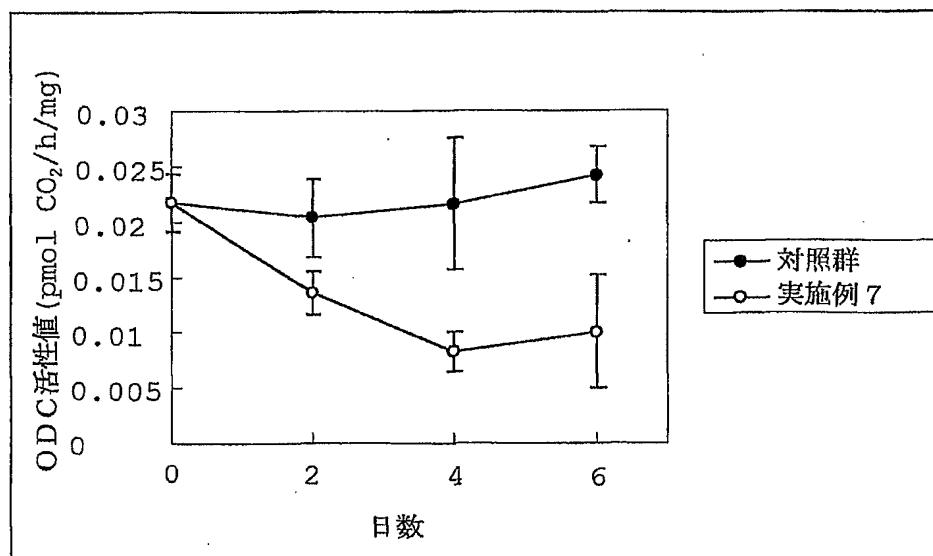


19/19

第 20 図



第 21 図



SEQUENCE LISTING

<110> SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY LIMITED; KOKEN CO., LTD.

5 <120> OLIGONUCLEOTIDE INTRODUCING PREPARATION

<130> 662639

<150> JP 2000-184502

10 <151> 2000-06-20

<160> 4

<210> 1

15 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20 <223> Phosphorothioate type anti-sense oligonucleotide

<400> 1

ctcgtaggcg ttgttagttgt 20

25 <210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Phosphorothioate type anti-sense oligonucleotide

<400> 2

5 tcatgattc ttgatgttcc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

10 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Phosphorothioate type sense oligonucleotide

15 <400> 3

acaactacaa cgcctacgag 20

<210> 4

<211> 20

20 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Phosphorothioate type scramble oligonucleotide

25 <400> 4

agtactaaag aactacaagg 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/05195A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ A61K48/00, 31/711, 31/7105, 47/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ A61K48/00, 31/711, 31/7105, 47/42

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97/02047 A1 (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 23 January, 1997 (23.01.97), & EP 844004 A1 & JP 9-71542 A	1-10
Y	WO 97/15330 A1 (Hyal Pharmaceutical Australia, Limited), 01 May, 1997 (01.05.97), & EP 859636 A1 & JP 2000-507915 A	1-10
X	WO 95/22611 A2 (The Regents of the University of Michigan), 24 August, 1995 (24.08.95), & US 6074840 A & US 5763416 A & US 5942496 A & EP 741785 A1 & JP 9-509825 A	1-10
A	EP 412554 A2 (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 13 February, 1991 (13.02.91), & JP 3-163032 A	1-10

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

"A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"B"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search
21 August, 2001 (21.08.01) Date of mailing of the international search report
04 September, 2001 (04.09.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A61K48/00, 31/711, 31/7105, 47/42

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A61K48/00, 31/711, 31/7105, 47/42

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 97/02047 A1 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO. LTD.) 23.1月.1997 (23.01.97) & EP 844004 A1 & JP 9-71542 A	1-10
Y	WO 97/15330 A1 (HYAL PHARMACEUTICAL AUSTRALIA LIMITED) 1.5月.1997 (01.05.97) & EP 859636 A1 & JP 2000-507915 A	1-10

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.08.01

国際調査報告の発送日

04.09.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信

4/C 9455



電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	WO 95/22611 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 24.8月.1995(24.08.95) & US 6074840 A & US 5763416 A & US 5942496 A & EP 741785 A1 & JP 9-509825 A	1-10
A	EP 412554 A2 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO. LTD.) 13.2月.1991(13.02.91) & JP 3-163032 A	1-10